

Evaluierung der tumorsuppressiven Eigenschaften des
„Interferon Regulatory Factor 1“ (IRF-1)

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Whilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Andrea Kröger
aus Vechta

1. Referent:	Prof. Dr. Jürgen Bode
2. Referent:	Prof. Dr. Rüdiger Cerff
eingereicht am:	08.04.1999
mündliche Prüfung am:	26.08.1999

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit der Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Kirchhoff, S., Kröger, A., Cruz, H., Tümmeler, M., Schaper, F., Köster, M. & Hauser H. Regulation of cell growth by IRF-1 in BHK-21 cells. *Cytotechnology* 22: 147-156 (1996)

Tagungsbeiträge

Kröger, A., Beckers, T., Sander, S., Kirchhoff, S. & Hauser H.: Interferon regulatory factor-1 activity as a potential target for screening of compounds with antitumor activity. (Poster) 4. KBF-Symposium, Braunschweig (1996).

Kröger, A., Beckers, T., Sander, S., Kirchhoff, S. & Hauser H.: Interferon regulatory factor-1 activity as a potential target for screening of compounds with antitumor activity. (Poster) Jahrestagung der Dechema, Münster (1997)

Kröger, A., Kirchhoff, S. & Hauser, H.: Interferon regulatory factor-1, a potential target for tumor therapy. (Vortrag) 2. Joint Meeting, International Society for Interferon and Cytokine Research, Jerusalem (1998).

1	EINLEITUNG	1
1.1	Interferone	1
1.1.1	Die biologischen Wirkungen von Interferonen	2
1.1.2	Interferon-induzierte Signaltransduktion.....	4
1.1.2.1	ISG-Induktion durch Typ I-Interferone.....	5
1.1.2.2	ISG-Induktion durch Typ II-Interferone.....	6
1.2	Die „Interferon Regulatory Factor“-Familie	6
1.2.1	„Interferon Regulatory Factor-1“ (IRF-1)	8
1.2.2	Aktivität von IRF-1 in der Zellproliferation und Apoptose	10
1.2.3	Tumorsuppressive Eigenschaften von IRF-1	10
1.3	Karzinogenese	11
1.3.1	Die Rolle von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen bei der Karzinogenese	12
1.3.2	Karzinogenese als „multi-step“-Prozeß.....	13
1.3.3	Karzinogenese im Tiermodell	14
1.4	Aufgabenstellung.....	16
2	ERGEBNISSE	17
2.1	Herstellung multicistronischer Expressionsvektoren	17
2.1.1	Das Vektorsystem.....	19
2.1.2	Funktionalität des polycistronischen Vektorsystems.....	21
2.2	Tumorsuppressive Eigenschaften von IRF-1 <i>in vitro</i>	23
2.2.1	Das Testsystem und die Funktionalität der Konstrukte.....	24
2.2.2	IRF-1 revertiert den transformierten Phänotyp.....	29
2.2.2.1	Autoregulatorische Kassette	30
2.2.3	IRF-1 inhibiert das Zellwachstum transformierter Zellen	32
2.2.4	Simultane Aktivierung von IRF-1 und Onkogenen führt zum Zelltod	34
2.3	Entwicklung eines Maustumormodells zur Charakterisierung der IRF-1 Eigenschaften <i>in vivo</i>	37
2.3.1	Das Maustumormodell	38
2.3.2	Identifizierung der "Founder"	40
2.3.3	Identifizierung doppelt transgener Tiere	42
2.4	Etablierung einer Screeningzelllinie für IRF-1 Induktoren und Aktivatoren	44
2.4.1	Zelllinie.....	46
2.4.2	Reportergene.....	49
2.4.3	Screeningzelllinie	51

2.4.4	Sekundärscreening.....	54
3	DISKUSSION	58
3.1	Tetrazyklin-regulierte Genexpression	58
3.2	IRF-1 revertiert den Phänotyp transformierter Zellen	60
3.3	IRF-1 induziert einen antiproliferativen Effekt.....	63
3.4	IRF-1 führt in transformierten Zellen zur Apoptose	65
3.5	Maustumormodelle zur Charakterisierung der IRF-1 Aktivität <i>in vivo</i>	67
3.6	Strategien zur Medikamentenentwicklung für die Krebstherapie	70
4	METHODEN	73
4.1	Geräte	73
4.2	Material	74
4.2.1	Filterpapiere und Transfermembranen	74
4.2.2	Autoradiographie.....	74
4.2.3	Chemikalien.....	75
4.2.4	Zellkulturmaterialien	75
4.2.5	Computerprogramme.....	75
4.3	Allgemeine Methoden	75
4.3.1	Sterilisation.....	75
4.3.2	Phenolisieren von Nukleinsäuren	76
4.3.3	Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren	76
4.3.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	76
4.3.4.1	Photometrische Bestimmung	76
4.3.4.2	Fluorimetrische Bestimmung.....	76
4.4	Arbeiten mit <i>E.coli</i>	77
4.4.1	Verwendete <i>E.coli</i> Stämme	77
4.4.2	Kulturmedien für Bakterien.....	77
4.4.3	Kultivierung von <i>E.coli</i>	78
4.4.4	Herstellung elektrokompetenter Bakterien.....	78
4.4.5	Elektrotransformation von <i>E.coli</i>	78
4.4.6	Anlage von Stammkulturen.....	79
4.5	Isolierung von Nukleinsäuren.....	79
4.5.1	Plasmidisolierung im analytischen Maßstab	79
4.5.1.1	„Boiling Prep“.....	79
4.5.1.2	„Mini“-Plasmidpräparation.....	80

4.5.2 Präparative Plasmidisolierung.....	80
4.5.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	82
4.5.3.1 „QIAquick“ Gel Extraktions Kit.....	82
4.5.3.2 „QIAEXII“ Gel Extraktions Kit.....	82
4.5.4 Isolierung von hochmolekularer DNA (HMW-DNA) aus Säugerzellen	82
4.5.5 Isolierung hochmolekularer DNA aus Mausschwänzen.....	83
4.5.6 Isolierung von RNA aus Säugerzellen.....	83
4.5.6.1 Isolierung von Gesamt-RNA	83
4.5.6.2 Isolierung von Poly (A) ⁺ RNA mit Hilfe von Dynabeads (dT) ₂₅	84
4.6 Modifikation von Nukleinsäuren	85
4.6.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	85
4.6.2 Auffüllen 5‘-überstehender Enden	85
4.6.3 Dephosphorylierung	86
4.6.4 Ligasereaktion	86
4.6.5 Radiaktive Markierung von Nukleinsäuren.....	87
4.6.6 „Southern Blotting“	87
4.6.6.1 Transfer	87
4.6.6.2 Hybridisierung	88
4.6.7 Northern Transfer	89
4.6.7.1 Hybridisierung von Northern Blots.....	90
4.6.8 Polymerase Chain Reaktion	91
4.6.8.1 DNA-Amplifikation durch PCR	91
4.7 Sequenzierung von DNA.....	92
4.8 Gelelektrophoresen.....	95
4.8.1 Agarose Gelelektrophorese.....	95
4.8.2 Polyacrylamid Gelelektrophoresen (PAGE).....	96
4.8.2.1 Tricin-SDS Polyacrylamidgele	96
4.8.2.2 Herstellung von Sequenziergelen.....	97
4.9 Arbeiten mit eukaryontischen Zellkulturen.....	98
4.9.1 Kulturmedien und Lösungen	98
4.9.2 Zelllinien und Viren.....	99
4.9.3 Kultivierung von Zelllinien	99
4.9.3.1 Passagieren.....	99
4.9.3.2 Langzeitlagerung.....	100
4.9.4 Gentransfer in Säugerzellen	100
4.9.4.1 Transfektion mittels Kopräzipitation	100

4.9.4.2 Durchführung einer Selektion.....	101
4.9.5 IFN-Induktion von Zellen.....	102
4.10 Proteinanalytik.....	102
4.10.1 Westernblot.....	102
4.10.2 Herstellung von Zellextrakten für Reportergen-Assays.....	103
4.10.3 Proteinbestimmung (Mikroassay).....	103
4.10.4 Bestimmung der Luciferaseaktivität.....	104
4.10.5 CAT-ELISA.....	104
4.10.6 Bestimmung der SEAP-Aktivität.....	105
4.10.6.1 Spektrometrische Bestimmung.....	105
4.10.6.2 „Phospha-Light-Assay“ von TROPIX.....	105
4.10.7 Bestimmung von Interferon.....	105
4.11 Plasmide.....	106
4.11.1 Erhaltene Plasmide.....	106
4.11.2 Hergestellte Plasmide.....	107
5 ABKÜRZUNGEN UND ZEICHEN	110
6 LITERATUR.....	112

Zusammenfassung

Die tumorsuppressive Wirkung von IRF-1 als Target für die Tumorthherapie wurde evaluiert. Hierfür wurde ein Tumormodell etabliert, mit dem die Wirkung von IRF-1 durch konditionale Transformation und differentielle Aktivierung von IRF-1 untersucht werden kann. Das Modell kann sowohl in permanenten Zelllinien als auch in transgenen Tieren eingesetzt werden.

Mit Hilfe dieses Tumormodells konnte gezeigt werden, daß die Fähigkeit von IRF-1 den tumorigenen Phänotyp von transformierten Zellen zu revertieren unabhängig von der Art des transformierenden Onkogens ist. Die gleiche Wirkung von IRF-1 konnte in Zellen erzielt werden, die kooperativ wirkende Onkogene exprimieren. Es konnte gezeigt werden, daß die Expression von IRF-1 in transformierten Zellen zu einem verstärkten antiproliferativen Effekt gegenüber nicht transformierten Zellen führt. Die Expression von IRF-1 in transformierten Zellen führt zur Induktion von Apoptose, während nicht transformierte Zellen lediglich in ihrer Proliferation inhibiert sind.

Durch die Übertragung des Tumormodells auf transgene Mäuse wurde ein Maustumormodell entwickelt, mit dem die Wirkung von IRF-1 differentiell auf Leber-spezifische Tumore untersucht werden kann, die durch externe Signale induziert werden können.

Aus der Kenntnis der tumorsuppressiven Wirkung von IRF-1 wurde eine Screeningzelllinie entwickelt, mit deren Hilfe in einem Hochdurchsatz-Screening (HTS) Substanzen identifiziert werden können, die zu einer Aktivierung oder Stimulation der IRF-1 Wirkung führen oder dieselbe Wirkung wie IRF-1 ausüben. Durch die Etablierung von Sekundärscreening-Systemen ist es möglich die Spezifität und Wirkebene der im HTS gefundenen Substanzen näher zu charakterisieren.

1 Einleitung

1.1 Interferone

Zu den Interferonen zählt man eine Reihe multifunktionaler Polypeptide mit verschiedenen biologischen Effekten. Interferon wurde 1957 entdeckt, als Isaacs und Lindenmann Zellen aus befruchteten Hühnereiern mit Influenzaviren inkubierten und im Kulturüberstand eine Substanz fanden, die Ei und Hühnerzellen vor weiteren Virusinfektionen schützen kann (Isaacs & Lindenmann, 1957). Die Interferenz dieser Substanz mit der viralen Replikation gab schließlich dieser Protein-Familie ihren Namen.

Neben der antiviralen Aktivität der Interferone vermitteln diese auch antiproliferative Wirkungen und üben Kontrollfunktionen bei der Differenzierung und Proliferation im zellulären Immunsystem aus. Aufgrund seiner antiproliferativen und antiviralen Eigenschaften ließen Interferone auf eine Reihe therapeutischer Anwendungen hoffen. Heute werden Interferone als konventionelle Medikamente gegen Erkrankungen wie chronische Hepatitis B, -C und Tumore wie Haarzell-Leukämie und Chronische Myelocytäre Leukämie (CML) eingesetzt. Erfolge werden auch bei der Behandlung von Patienten mit Multipler Sklerosis (MS) erzielt. Die molekulare Grundlage der Therapeutischen Effekte ist aber weitgehend unklar.

Interferone werden aufgrund ihrer biochemischen und molekularen Eigenschaften in zwei Gruppen zusammengefaßt. IFN- α und IFN- β werden, wegen ihrer starken Sequenzhomologie, der Kodierung auf dem humanen Chromosom 9, des Fehlens von Introns, serologischer Ähnlichkeiten, der Säurestabilität und der Bindung an den gleichen Rezeptor zum Interferon Typ I zusammengefaßt. Mit Ausnahme von Nervenzellen werden Interferone des Typs I von allen bisher untersuchten Zellen gebildet und sekretiert, wobei Monozyten und Makrophagen vorwiegend IFN- α produzieren und Fibroblasten vorwiegend IFN- β . Zum IFN Typ II zählt man zur Zeit nur das IFN- γ . IFN- γ kodiert auf dem humanen Chromosom 12, besitzt Exons, ist säurelabil und bindet an einen eigenen Rezeptortyp. Hauptproduzenten des IFN- γ sind die T-Helferzellen und die „Natürlichen Killerzellen“, IFN Typ II-Rezeptoren lassen sich jedoch auf den meisten Zelltypen finden.

1.1.1 Die biologischen Wirkungen von Interferonen

Die Wirkung von Interferonen reicht von antiviralen über immunmodulatorische bis hin zu antiproliferativen Aktivitäten. Die antivirale Wirkung des Interferons hat verschiedene Ursachen. Zum einen führen verschiedene Wege zu einer Hemmung des Translationsapparates und somit zur Reduktion der Translation, zum anderen bewirken einige Funktionen des Interferons eine Veränderung der Infektionskompetenz der Viren durch den Apparat der Wirtszelle. Ein Teil der antiviralen Aktivität von Interferonen ist abhängig von der Gegenwart doppelsträngiger RNA (dsRNA), die im Verlauf der Replikation der meisten Viren auftritt, während sie in uninfizierten Zellen nicht zu finden ist. dsRNA führt neben der Induktion von Interferonen zu einer Aktivierung von Interferon-induzierten Enzymen wie 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase (OASE) (Gribaudo et al., 1991) und der Protein Kinase R (PKR) (Haines et al., 1991).

Die OASE synthetisiert 2'-5'-Oligoadenylate mit einer Länge von 2-10 Nukleotiden (Kerr & Brown, 1978). Interferone des Typ I und II induzieren die OASE transkriptionell, die Aktivierung des Enzyms erfolgt aber durch dsRNA. Latent in der Zelle vorkommende Ribonuklease L (RNaseL) wird durch die Oligoadenylate aktiviert und degradiert je nach Virustyp und Art der infizierten Zelle neben viraler auch zelluläre mRNA (Slattery et al., 1979; Benedetti & Baglioni, 1984). Eine wichtige Funktion der RNaseL bei der Kontrolle der Zellproliferation konnte mit Hilfe einer dominant negativen Mutante nachgewiesen werden, bei Expression in Nacktmäusen führt diese zur Tumorbildung (Hassel et al., 1993). Die PKR ist eine Serin/Threonin Protein Kinase, die an den Ribosomen assoziiert ist und transkriptionell durch Interferone induziert wird. Nach Bindung von dsRNA kommt es zu einer Aktivierung durch Autophosphorylierung (Galabru & Hovanessian, 1987). Aktivierte PKR ist in der Lage, die α -Untereinheit des Initiationsfaktors eIF2 zu phosphorylieren, was zu einer irreversiblen Komplexbildung von eIF2 und eIF2B führt. eIF2B ist für den GDP→GTP-Austausch nach erfolgter Translationsinitiation erforderlich, durch den eIF2/eIF2B Komplex kommt es zu einem eIF2-GTP-Mangel. Eine Anlagerung der Initiator-tRNA an die ribosomale 40S-Untereinheit kann nicht stattfinden, und die Translation kommt zum Erliegen (Safer, 1983). Über einen dsRNA unabhängigen Weg kommt es durch eine 2'-5'-spezifische Phosphodiesterase zu einer Degradation des pCpCpA-Endes der tRNA und dadurch zur Blockade der Elongation (Schmidt et al., 1979). Interferon Sti-

mulation führt außerdem zu einer Reduktion der Glykosyltransferaseaktivitäten, die zu einer veränderten Proteinmodifikation, z. B. von Hüllproteinen, führt. Zusätzlich kommt es zu einer Veränderung an der Plasmamembran, was schließlich die Virusfreisetzung und Anheftung an die Zelle reduziert. Eine Übersicht über die antiviralen Aktivitäten von Interferonen gibt Abb.1.1.

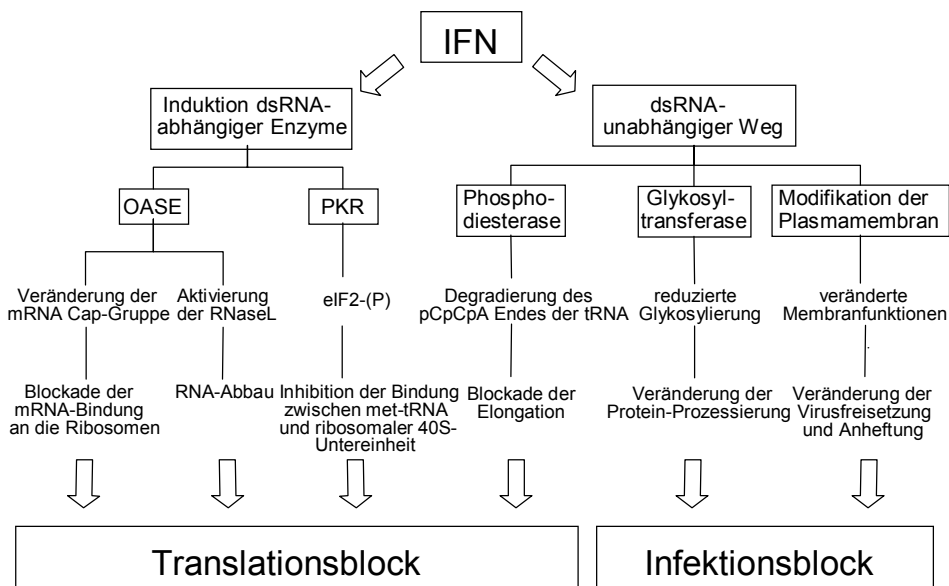


Abb. 1.1 Antivirale Effekte von Interferonen

Interferon-aktivierte Gene vermitteln das antivirale Potential. Die Induktion des antiviralen Zustandes erfolgt über dsRNA-abhängige und dsRNA-unabhängige Wege. In der Abbildung sind einige der bekannten Enzyme, ihre zellulären Zielobjekte und die hervorgerufenen Effekte schematisch aufgeführt. (verändert nach Bode & Hauser, 1990)

An der antiproliferativen Wirkung von Interferonen sind mehrere „Interferon Stimulated Genes“ (ISG) beteiligt. Obwohl zum Teil gleiche Gene induziert werden, scheint hier ein anderer Signaltransduktionsweg zu wirken, da im Gegensatz zum antiviralen der antiproliferative Effekt erst bei höheren Interferonkonzentrationen auftritt. ISGs, die durch eine Wirkung auf den Zellzyklus ihren antiproliferativen Effekt ausüben, sind z.B. c-myc, pRb, ZyklinA, G1-Zykline und E2F. Daneben gibt es ISGs, die ihre Wirkung unabhängig vom Zellzyklus ausüben, wie die Translationsinhibition durch PKR. Neben ihrer antiviralen Wirkung besitzt die PKR antiproliferative (Chong et al., 1992; Koromilas et al., 1992) und tumorsuppressive Eigenschaften (Koromilas et al., 1992; Barber et al., 1995). Nach Induk-

tion durch den Interferon Regulatory Factor-1 (IRF-1) vermittelt die PKR Zellwachstumsinhibition, die durch die Expression der dominant negativen Mutante der PKR (Koromilas et al., 1992) aufgehoben werden kann (Kirchhoff et al., 1995). Eine Beteiligung der OASE an der Interferon-induzierten Proliferationshemmung wird diskutiert, da sowohl injiziertes 2'-5'Oligoadenylat (Hovanessia & Wood, 1980) als auch überexprimierte OASE (Zhou et al., 1993) zu einer Proliferationsreduktion führen, während die Expression einer dominant negativen RNaseL-Mutante die antiproliferative Wirkung des Interferons reduziert (Hassel et al., 1993).

1.1.2 Interferon-induzierte Signaltransduktion

Die weitreichenden biologischen Wirkungen von Interferonen werden durch die Aktivierung einer Reihe von Interferon stimulierter Gene (ISG) vermittelt. ISGs werden spezifisch durch IFN- α , IFN- β oder IFN- γ induziert. Einige ISGs reagieren synergistisch auf die Induktion durch verschiedene IFN-Typen. Die Induktion der ISGs erfolgt nach der Bindung des Interferons an seinen Rezeptor. IFN-Rezeptoren vom Typ I und II gehören zur Zytokin-Rezeptor-Superfamilie. Sie bestehen aus je zwei transmembranen Polypeptidketten (Mullermann & Pfeffer, 1995) die nach Bindung ihres Liganden dimerisieren und den eigentlichen Rezeptor ausmachen, der zur Signalweiterleitung der Zelle fähig ist (Pesk & Lange, 1987). Die Signaltransduktion, bei der keine Proteinsynthese erforderlich ist, sondern latent im Zytoplasma vorliegende Faktoren aktiviert werden, führt zur transkriptionellen Aktivierung verschiedener ISGs (Friedmann & Stark, 1985; Revel & Chabat, 1986).

Entsprechend der Induzierbarkeit der ISGs durch die verschiedenen Interferon-Klassen wurden in ihren Promotoren verschiedene Sequenzelemente charakterisiert. Das für die IFN Typ I-Induktion notwendige „Interferon Stimulated Response Element“ (ISRE) mit der Konsensus-Sequenz AGTTTCNNTTC/T wie auch die für die IFN Typ II-Induktion notwendige „Interferon- γ Activation Site“ (GAS) mit der Konsensus-Sequenz TTNCNNNAA üben ihre Induktor-spezifische Enhancerfunktion auch in heterologen Promotor-Systemen aus (Levy et al., 1988; Decker et al., 1989).

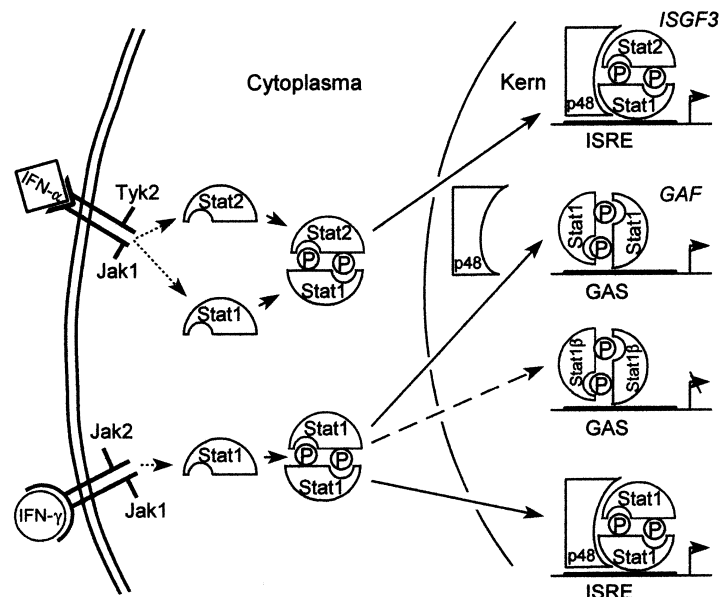


Abb. 1.2 ISG-Induktion durch Interferon

Darstellung der IFN- α und IFN- γ Signaltransduktionswege. Die Jak-Kinasen werden nach Rezeptorbindung von IFN an Tyrosin autophosphoryliert. Die Phosphotyrosin-Reste dienen als Erkennungsstellen für die Stat-Proteine. Die Tyrosin-Phosphorylierung der Stat-Proteine induziert ihre Homo- bzw. Heterodimerisierung. Als Konsequenz kommt es zu einer Kerntranslokation und zur DNA-Bindung der aktivierten Dimere. Eingekreiste P: Tyrosin-Phosphate.

1.1.2.1 ISG-Induktion durch Typ I-Interferone

Die Induktion von ISGs durch Typ I-Interferone erfolgt über die Bindung des „Interferon Stimulated Factor 3“ (ISGF3) an ISRE Konsensus-Sequenzen (Levy et al., 1988). Aktives ISGF3 besteht aus zwei funktionellen Untereinheiten: ISGF3 γ und ISGF3 α (Levy et al., 1989). ISGF3 γ ist ein 48 kDa Protein (p48), das die DNA-bindende Untereinheit von ISGF3 ausmacht und ein Mitglied der IRF-Familie ist. ISGF3 α setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen, dem Stat1 α (p91) („Signal Transducer and Activator of Transkription“) oder dem Stat1 β (p84) und dem Stat2 (p113) (Fu et al., 1990; Schindler et al., 1992). Die beiden Stat1-Proteine sind unterschiedliche Spleißvarianten einer mRNA (Fu et al., 1992). Alle drei Faktoren liegen konstitutiv in der Zelle vor.

Durch Bindung des IFN- α oder IFN- β an den IFN Typ I Rezeptor kommt es zu einer Aktivierung der Tyrosin-Proteinkinasen Tyk2 und Jak1, die an der zytoplasmatischen Seite des Rezeptors assoziiert sind (Müller et al., 1993; Darnell et al., 1994). Nach einer Autophosphorylierung der beiden Kinasen kommt es zur Tyrosin-Phosphorylierung der beiden Stat-

Proteine (Imrota et al., 1994), diese sind über SH2 (Src-Homology 2)-Domänen am Tyrosin-phosphorylierten Rezeptor lokalisiert. SH2-Domänen vermitteln eine Wechselwirkung mit Phosphotyrosinresten (Feng & Pawson, 1994). Die Phosphorylierung der Stat-Proteine ermöglicht die Bildung des ISGF3 α -Komplexes, der durch die Interaktion der Proteine durch Phosphotyrosin/SH2 Wechselwirkungen stabilisiert wird (Shuai et al., 1994). Nach Translokation in den Zellkern assoziiert ISGF3 α mit ISGF3 γ (p48) und stimuliert durch Bindung an ISRE-Elemente die ISGs. p48 allein weist nur eine geringe Affinität zu ISRE-Elementen auf (Qureshi et al., 1995).

1.1.2.2 ISG-Induktion durch Typ II-Interferone

Der für die IFN- γ Induktion verantwortliche Transkriptionsfaktor GAF („ γ Activated Factor“) wurde als p91 Homodimer identifiziert (Shuai et al., 1993). Nach Bindung von IFN- γ an den IFN Typ II-Rezeptor werden die an den Rezeptor assoziierten Tyrosinkinasen Jak1 und Jak2 aktiviert. Genau wie nach der IFN Typ I-Rezeptor Aktivierung binden Stat1-Moleküle an Phosphotyrosine und werden phosphoryliert. Die sich bildenden Stat1-Homodimere können nach Translokation in den Zellkern GAS-Elemente binden und die Transkription der entsprechenden Gene induzieren (Shuai et al., 1994). Obwohl Stat1 β (p84)-Homodimere auch am Rezeptor phosphoryliert werden und DNA-Bindungsaktivität aufweisen, zeigen sie keine induzierende Aktivität. Die fehlenden 38 Aminosäuren am C-Terminus der Proteine scheinen bei der IFN- γ abhängigen Signaltransduktion eine Rolle zu spielen (Shuai et al., 1993). IFN- γ induziert den Transkriptionsfaktor IRF-1, wodurch eine indirekte Induktion von ISRE-Promotoren stattfindet, da IRF-1 selbst die Fähigkeit besitzt, ISRE-Promotoren zu aktivieren. Außerdem konnte gezeigt werden, daß Stat1 α -Homodimere nach IFN- γ -Induktion mit ISGF3 γ assoziieren und ISRE-Promotoren aktivieren (Blyssen et al., 1995).

1.2 Die „Interferon Regulatory Factor“-Familie

Die „Interferon Regulatory Factor“-Familie (IRF) ist eine wachsende Familie von Transkriptionsfaktoren. IRF-1 und IRF-2 sind die am besten charakterisierten Proteine der Fa-

milie. Mittlerweile gibt es sieben weitere Mitglieder: IRF-3, ISGF3 γ /p48, ICSBP, PIP/LSIRF/IRF-4, IRF-5, IRF-6 und IRF-7.

Alle Proteine der IRF-Familie weisen eine hoch konservierte Sequenz von ca. 120 Aminosäuren im N-Terminus des Proteins auf. Diese Region beinhaltet die DNA-bindende Domäne. Charakteristisch sind fünf Tryptophane in einem Abstand von 10-15 Aminosäuren (Driggers et al., 1990), die auch im c-Myb Onkoprotein gefunden wurden (Veals et al., 1992). Strukturdaten zeigen allerdings, daß die Tryptophane keine wichtige Rolle spielen.

IRF-3 wurde auf Grund seiner Sequenzhomologie zur IRF-Familie identifiziert. Es wird in allen Geweben konstitutiv exprimiert und ist im Zytoplasma lokalisiert (Au et al., 1995). Neuere Daten zeigen, daß IRF-3 für die frühe Interferoninduktion nach Virusinfektion verantwortlich ist (Marie et al., 1998). Nach Virusinfektion kommt es zu einer Serin/Threonin-Phosphorylierung am C-Terminus des Proteins, was zu einer Kerntranslokation führt (Yoneyama et al., 1998; Weaver et al., 1998). Nach Bildung eines Komplexes mit CBP/p300 werden IFN α 4, IFN- β und einige ISGs transaktiviert (Lin et al., 1998; Sato et al., 1998; Schafer et al., 1998; Yoneyama et al., 1998).

Ein weiteres Mitglied der IRF-Familie ist p48 (ISGF3 γ), das schon im Zusammenhang mit der IFN-Signaltransduktion als Bestandteil des ISGF3-Komplexes beschrieben wurde (1.1.2). ISGF3 γ liegt konstitutiv in der Zelle vor, die Expression kann durch Virusinfektion oder IFN- γ Stimulation induziert werden. Neben der unter 1.1.2.1 beschriebenen Funktion bei der Induktion von IFN Typ I-induzierbaren ISGs scheint es auch eine Funktion bei der Induktion von IFN- β zu haben. In embryonalen Fibroblasten, bei denen beide Allele der IRF-1 und IRF-2 Gene experimentell deletiert wurden, bindet ISGF3 γ an das IRF-bindende DNA-Element des IFN- β Promotors (Kawakami et al., 1995). Eine Phosphorylierung innerhalb des homologen Bereichs der IRF-Familie scheint für die DNA-Bindeaktivität notwendig zu sein (Veals et al., 1993). Im C-terminalen Bereich des Proteins befindet sich eine Domäne, die für die Interaktion mit ISGF3 α verantwortlich ist.

Das Gen des ICSBP („Interferon Consensus Sequence Binding Protein“) wurde als Faktor kloniert, der das ISRE-Element von MHC Klasse I-Promotoren binden kann (Driggers et al., 1990). ICSBP wird in Säugern nur in hämatopoetischen Zellen exprimiert und ausschließlich durch IFN- γ induziert (Driggers et al., 1990). Es zeigt wie IRF-2 keine Funktion als Transaktivator und kann ähnlich wie IRF-2 als Antagonist von IRF-1 wirken (Nelson et

al., 1993; Weisz et al., 1994). Eine weitere Fähigkeit von ICSBP ist die Bildung von Heterodimeren mit Mitgliedern der IRF-Familie (Nelson et al., 1993; Bovolenta et al., 1994). Für die DNA-Bindung der Heterodimere ist eine Tyrosin-Phosphorylierung von ICSBP notwendig, die zu einer Veränderung der Bindungsaffinität führt. Die Tyrosin-Phosphorylierung kann somit die Interaktion von ICSBP mit anderen IRFs modulieren, was zu einer Änderung der DNA-Bindungsaffinität führt und biologische Effekte beeinflussen kann (Sharf et al., 1997).

LSIRF (IRF-4) wurde aus murinen Milzzellen kloniert (Matsuyama et al., 1995). Es bindet ISRE-Elemente, ist aber nicht durch IFN induzierbar. Die Induktion von LSIRF erfolgt durch bestimmte Antigenrezeptor-vermittelte Stimuli. In B- und T-Zellen wurde ein Faktor identifiziert mit einer zu LSIRF identischen Aminosäuresequenz. Der ausschließlich in diesen Zellen exprimierte Faktor wurde PIP („PU.1 Interaction Partner“; IRF-4) genannt (Eisenbeis et al., 1995). PIP zeigt eine große Sequenzhomologie zu ICSBP und ähnelt diesem funktionell, beide Proteine bilden mit PU.1 einen DNA-bindenden dimeren Komplex (Eisenbeis et al., 1995).

Neben IRF-5 und IRF-6, deren Funktion unbekannt ist, ist IRF-7 das bisher zuletzt entdeckte Mitglied der IRF-Familie. IRF-7 wurde durch die Bindung an die QRE-2 Region im Promotor des Kernantigen1 aus Epstein-Barr-Virus identifiziert (Zhang & Pagano, 1997). IRF-7 scheint eine Funktion in der späten Induktion von IFN- α -Genen zu haben (Marie et al., 1998; Au et al., 1998). Nach Induktion von IRF-7 durch ISGF3 kommt es durch Virusinduktion zu einer Modifikation im C-Terminus des Proteins und zur Transaktivierung aller IFN- α Gene mit Ausnahme des IFN- α 4 Gens (Marie et al., 1998).

1.2.1 „Interferon Regulatory Factor-1“ (IRF-1)

IRF-1 wurde durch seine Fähigkeit, an PRDI-Sequenzen des IFN- β Promotors bzw. an Multimere des AAGTGA-Hexamermotives zu binden, identifiziert (Fujita et al., 1988). IRF-1 ist nicht nur in der Lage, PRDI- und PRDII-Elemente aus dem IFN- β Promotor zu binden, sondern kann bei Überexpression auch zu einer Induktion von IFN- β und ISGs führen (Miyamoto et al., 1988; Kirchhoff et al., 1995). Daß IRF-1 eine Rolle bei der Induktion des IFN- β Gens spielt wurde durch Antisense-Experimente gezeigt (Reis et al.,

1992). Allerdings wurde in Mäusen, in denen beide Allele des IRF-1 Gens deletiert wurden, gezeigt, daß IRF-1 für die Virus-vermittelte IFN- β -Induktion nicht essentiell (Reis et al., 1994), während die dsRNA-vermittelte IFN- β -Induktion in embryonalen Maus-Fibroblasten (MEF) dieser Mäuse verringert ist (Matsuyama et al., 1993; Reis et al., 1994). Für die IFN- β -Induktion müssen daher verschiedene Wege zur Verfügung stehen: ein nach Virusinduktion, IRF-1-unabhängiger Weg und ein nach dsRNA-Stimulation, IRF-1-abhängiger Weg.

IRF-2 wurde auf Grund seiner Homologie zu IRF-1 kloniert (Harada et al., 1989). IRF-1 und IRF-2 binden mit gleicher Affinität an das PRDI-Element und stellen ein sich antagonisierendes Paar dar. IRF-1 ist ein Transkriptionsaktivator und IRF-2 ein Transkriptionsrepressor (Fujita et al., 1989; Harada et al., 1990). Außer in embryonalen Zellen, werden IRF-1 und IRF-2 in allen Zellen in geringem Maß konstitutiv exprimiert (Harada et al., 1990). Durch eine wesentlich größere Halbwertszeit von IRF-2 (8 h) gegenüber IRF-1 (0.5 h) kommt es zu einer Akkumulation von IRF-2 (Watanabe et al., 1991). Dies führt vermutlich zu einem Verdrängen von IRF-1 von den gemeinsamen Bindungsstellen.

Die Expression des IRF-1 Gens wird durch eine Vielzahl von Induktoren wie Viren, dsRNA, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-6, LIF, TNF α und Prolaktin induziert (Fujita et al., 1989; Abdollahi et al., 1991; Watanabe et al., 1991; Lamphier & Taniguchi, 1994). Besonders starke Induktoren sind Viren und IFN- γ . Die Aktivierung von IRF-1 führt letztlich auch zur Induktion des IRF-2-Gens (Cha & Deissroth, 1994). Beide Gene werden durch ihre Induktoren transient induziert (Harada et al., 1989). Die Kopplung der Genaktivität von IRF-1 und IRF-2 kann durch den Aufbau der Promotoren erklärt werden. Der Promotor des IRF-1 Gens enthält Sp1-Boxen, eine Bindungsstelle für NF κ B und eine GAS-Bindungsstelle und ist nicht autoreguliert (Sims et al., 1993; Harada et al., 1994a; Stevens et al., 1995). Außerdem wurde eine IPCS („IRF-1 p53 Common Sequence“) identifiziert, die sowohl im Promotor von IRF-1 als auch von p53 enthalten ist (Lallemand et al., 1997). An diese Sequenz bindet der nukleäre Faktor IPCS-BF („IPCS-Binding Factor“), der eine zentrale Rolle in der Kontrolle der Zellproliferation und /oder der Apoptose spielen soll (Lallemand et al., 1997). Der IRF-2-Promotor enthält eine IRF-1-Erkennungssequenz (Harada et al., 1994) und wird sowohl durch IRF-1 als auch durch IFN-Stimulation aktiviert (Cha & Deissroth, 1994).

1.2.2 Aktivität von IRF-1 in der Zellproliferation und Apoptose

Neben der Induktion von Interferonen bewirkt die Überexpression von IRF-1 eine Proliferationsinhibition (Kirchhoff et al., 1993) und vermag das onkogene Potential von IRF-2 zu überkommen (Harada et al., 1993). Für die antiproliferative Aktivität von IRF-1 ist sowohl die DNA-Bindungsaktivität als auch die Transaktivierungs-Aktivität des Proteins essentiell (Kirchhoff et al., 1993). Die antiproliferative Aktivität von IRF-1 ist nicht auf den Effekt der IFN-Induktion zurückzuführen (Kirchhoff et al., 1995), sondern ist Resultat der Induktion von IRF-1-induzierbaren Genen wie PKR.

Die Induktion des IRF-1-Targetgens PKR führt zu einer IFN-unabhängigen Proliferationsinhibition in NIH3T3-Zellen, während die Expression einer dominant negativem Mutante die Proliferationsinhibition aufhebt (Kirchhoff et al., 1995). Wie bereits in Abschnitt 1.1.1 beschrieben, inhibiert die Überexpression von 2'-5'-OASE die Zellproliferation während die Überexpression einer dominant negativen Mutante der RNaseL zu einer Aufhebung der antiproliferativen Effekte führt (Hassel et al., 1993). Der Einfluß von IRF-1 auf Proteine, die den Zellzyklus beeinflussen, konnte durch Transfektionsexperimente gezeigt werden. p53 und IRF-1 induzieren kooperativ p21 (WAF1, CIP1), ein Mitglied der Zyklin-abhängigen Kinase (CDK)-Inhibitoren (Tanaka et al., 1996). Spleenozyten aus Mäusen, in denen beide Allele des IRF-1 Gens deletiert sind, exprimieren kein IL-1 β -konvertierendes Enzym (ICE), ein Homolog des Zelltodgens *ced-3* aus *Caenorhabditis elegans*. Durch Expression von exogenem IRF-1 kommt es zur Induktion von ICE und zu einer Erhöhung des Zelltods durch Apoptose nach γ -Bestrahlung (Tamura et al., 1995). Die Rolle von IRF-1 bei der Induktion von Apoptose wird diskutiert (Kirchhoff & Hauser, 1999; Tanaka et al., 1994a).

1.2.3 Tumorsuppressive Eigenschaften von IRF-1

IRF-1 weist einige Eigenschaften eines Tumorsuppressors auf, so ist das Gen des humanen IRF-1 ist auf dem langem Arm des 5. Chromosoms an Position 5q31.1 lokalisiert (Itoh et al., 1991). Eine Deletion dieses Bereichs korreliert mit dem Auftreten von Akuter Myelocytärer Leukämie (AML) und dem Präleukämischen Myelodysplastischem Syndrom (MDS) (Willman et al., 1993). Veränderte Spleißing-Produkte der IRF-1 mRNA durch

„Exon-skipping“ wurde ebenfalls mit großer Häufigkeit in entsprechenden Zellen von Leukämie- oder MDS-Patienten entdeckt (Harada et al., 1994b).

Untersuchungen in Zellkultur und Nacktmäusen bestätigen die tumorsuppressive Wirkung von IRF-1. Der transformierte Phänotyp von fosB- oder c-myc-transformierten NIH3T3-Zellen kann durch die Expression von IRF-1 revertiert werden (Tanaka et al., 1994b; Harada et al., 1993), während durch das Onkogen HER1 transformierte Zellen nach IRF-1 Expression apoptotisch sterben (Kirchhoff & Hauser, 1999). Das c-Ha-ras-Onkogen transformiert embryonale Fibroblasten (EF) nur bei Vorhandensein eines zweiten Onkogens. In EF-Zellen, in denen beide Kopien des IRF-1 Gens deletiert sind, reicht die onkogene Aktivität von c-Ha-ras jedoch zur Transformation aus (Tanaka et al., 1994a). Transformierte Zellen können nach Transplantation in Nacktmäuse Tumore bilden. Nicht-immunogene Sarkomzelllinien verlieren diese Fähigkeit nach Induktion von exogenem IRF-1 (Yim et al., 1997).

Die beschriebenen Eigenschaften von IRF-1 weisen auf eine tumorsuppressive Aktivität von IRF-1 hin. Tatsächlich zeigen aber Mäuse, in denen beide Allele des IRF-1 Gens deletiert sind, keine erhöhte Tumorzinzidenz.

1.3 Karzinogenese

20% der Gesamtsterblichkeit in Deutschland wird durch Krebs verursacht. Damit ist Krebs neben Herz-Kreislaufkrankungen die häufigste Todesursache (Becker et al., 1984).

Unter Krebs versteht man die abnorme Vergrößerung eines Gewebes, das durch autonome, progressive und überschießende Proliferation körpereigener Zellen entsteht. Verschiedene Beobachtungen sprechen dafür, daß Krebs durch genetische Veränderungen entsteht, so wachsen Tumore klonal d.h. sie entstehen aus einer einzelnen entarteten Zelle (Fialkow, 1976). Außerdem spricht der regelmäßige Nachweis bestimmter Chromosomenveränderungen wie z.B. der Austausch von Chromosomenabschnitten bei Leukämien (Philadelphia-Chromosom) dafür, daß Veränderungen auf DNA-Ebene für das Tumorzuchstum verantwortlich sind (Groffen et al., 1984).

Ursachen für genetische Veränderungen können chemische Karzinogene, ionisierende Strahlung, Viren oder familiäre Disposition sein. Dabei muß die DNA-Schädigung nicht

direkt durch die Substanzen oder die Ereignisse selbst hervorgerufen werden. So werden z.B. einige chemische Karzinogene erst durch Oxygenase-Systeme wie Cytochrom P450 metabolisiert und in reaktive Stoffwechselprodukte überführt.

1.3.1 Die Rolle von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen bei der Karzinogenese

Versuche zur Induktion von Krebs in Labornagetieren durch Chemikalien und epidemiologische Daten in humanen Populationen haben gezeigt, daß die Krebsentstehung ein mehrstufiger Prozeß ist. Dieser verläuft über diskrete morphologische, biochemisch und genetisch veränderte Stadien von präneoplastischen Veränderungen hin zu malignen Tumoren (Farber et al., 1980; McLellan, 1988). Die Charakterisierung der einzelnen distinkten Stufen auf molekularer Ebene zeigt, daß eine Deregulation der Expression zahlreicher Gene, die in Zusammenhang mit der Zellteilungskontrolle und der Differenzierung stehen, an der Krebsentstehung beteiligt ist (Hunter und Pines, 1991).

Das Zellwachstum in höheren Organismen ist streng kontrolliert und wird durch externe Signale gesteuert. Jede Zelle reagiert dabei auf zwei Typen wachstumsregulierender Signale: 1) wachstumsstimulierende Signale und 2) wachstumshemmende Signale. Bei erhöhter Expression in Folge von Deregulation oder Mutation können an der Wachstumskontrolle beteiligte Gene als Onkogene wirken. Als Ergebnis kommt es zu einer Stimulation des Zellwachstums unabhängig von mitogenen Wachstumssignalen (Aaronsen, 1991). In Analogie zu der Funktion von Onkoproteinen im mitogenen Signaltransduktionsweg sind Tumorsuppressoren Proteine des intrazellulären Signaltransduktionsweges, die die Zelle dazu befähigen wachstumshemmende Signale aus der Umgebung zu realisieren (Levine, 1993; Weinberg, 1991). Bei Verlust einer Komponente dieses Signalweges können die Zellen ihre Fähigkeit, auf externe inhibitorische Faktoren zu reagieren, verlieren. Die Inaktivierung eines solchen Signaltransduktionselementes kann zu einer neoplastischen Dysregulation des Wachstums führen.

Die Expressionsmuster zahlreicher Tumorsuppressorgene und Onkogene sind in Karzinomen verändert. In vielen Fällen ist die Funktion von Tumorsuppressoren durch Deletionen, Punktmutationen und Verlust eines oder beider Allele gestört. Die wichtigsten Tumorsuppressoren, die mit humanen Tumoren assoziiert sind, sind Rb, p53, WT1, NF1, FAP/APC und DCC (Weinberg, 1991; Marshall, 1991; Kamb et al., 1994).

Onkogene werden ihrer Funktion entsprechend in verschiedene Gruppen eingeteilt: 1) Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktor-Rezeptoren; 2) GTP-bindende und zytoplasmatische Proteine und 3) nukleäre Proteine. Beispiele für Onkogene der verschiedenen Gruppen, die mit humanen Tumoren assoziiert sind, sind HER/erbB-, ras- und myc-Onkogene. Die Tumorentwicklung ist ein Mehrschritt-Prozeß, bei dem es zu einer sequentiellen Anhäufung von DNA-Mutationen in einer einzelnen Zelle kommt, die zu einer malignen Entartung führen kann (Fearon & Vogelstein, 1990; Hunter, 1991). Dabei müssen sich Onkogene in ihrer Wirkung komplementieren. Onkogene der verschiedenen Klassen wirken kooperativ und führen zur Tumorbildung, so wurde ein kooperativer Effekt von c-myc und c-Ha-ras bei der Tumorentwicklung nachgewiesen (Sinn et al., 1987; Sandgren et al., 1989).

1.3.2 Karzinogenese als „multi-step“-Prozeß

Das „multi-step“-Konzept der Karzinogenese unterteilt den Prozeß der Krebsentwicklung in drei Stadien: Initiation, Promotion und Progression. In vielen verschiedenen humanen Tumoren, wie zum Beispiel Brust-, Hirn-, Lungen-, Knochen- und Dickdarm-Tumoren, wurde gezeigt, daß mehr als ein Gen mutiert vorliegt. Da Dickdarm-Tumore durch sehr gut definierte morphologische Stadien charakterisiert sind, wurde am Beispiel dieses Tumortyps eine Reihenfolge beschrieben, in welcher tumorassoziierte Mutationen während der Karzinogenese erfolgen (Fearon und Vogelstein, 1990). Die Entwicklung des Dickdarmtumors wird initiiert durch eine Mutation des APC-Tumorsuppressorgens (Abb. 1.3), die ein inaktives, verkürztes APC-Protein entstehen läßt (Initiation). Eine Mutation des APC-Gens kann somatischen Ursprungs sein und zur Initiation eines einzelnen Dickdarmtumors führen (Powell et al., 1992) oder über die Keimbahn übertragen werden, was in einer Prädisposition für Dickdarmtumore resultiert (Grodin et al., 1991). Patienten mit einer derartigen Keimbahnmutation entwickeln eine Vielzahl im Dickdarm verteilter Tumorknoten. Die APC-Mutation führt zunächst zu benignen Adenomen, die sich schrittweise vergrößern. In einzelnen dieser noch benignen Tumorzellen erfolgt oft eine Mutation im K-ras-Gen, welche zu einer klonalen Expansion der betroffenen Zellen führt (Promotion). Nachfolgende Mutationen in den DCC- und p53-Tumorsuppressorgenen vervollständigen den Prozeß und bedingen weitere klonale Zellexpansionen, die schließlich zum Übergang vom benignen zum malignen Stadium führen (Progression). Keines der Stadien der

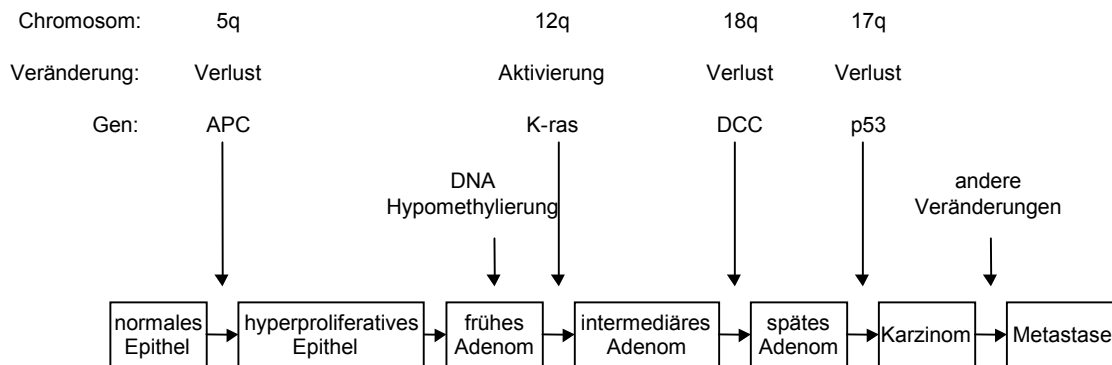


Abb. 1.3 Genetisches Modell der Dickdarm-Tumorgenese. (verändert nach Fearon & Vogelstein, 1990)

Tumorgenese ist statisch, so daß sich weitere Mutationen ereignen, die zu Subpopulationen mit steigender Wachstumsautonomie führen. In vielen humanen Tumoren scheinen Mutationen in einem bestimmten Gen weitere Genmutationen zu erleichtern. Tatsächlich gibt es eine Präferenz für bestimmte Mutationen obwohl ihre zeitliche Sequenz variieren kann. Bei chronischer myelocytärer Leukämie, Dickdarm-Tumoren und Blasenkrebs gehen Mutationen in dem Abl- und dem APC-Gen und in einem noch nicht identifizierten Gen auf Chromosom 9q eindeutig anderen Mutationen voran (Powell et al., 1992; Vogelstein und Kinzler, 1993). Das Modell der Dickdarmkrebs-Entstehung von Fearon und Vogelstein (Abb. 1.3) gilt als Paradigma für die Karzinogenese im allgemeinen und zeigt die Wichtigkeit sequentieller genetischer Veränderungen während des Prozesses der Krebsentwicklung.

1.3.3 Karzinogenese im Tiermodell

Die Entwicklung von Tumoren beim Menschen ist experimentell nicht zugänglich. Deshalb wurden Tiermodelle entwickelt, in denen die Karzinogenese untersucht werden kann. Solche Tiermodelle beruhen auf unterschiedlichen Methoden: 1) Etablierung von Inzuchtstämmen; 2) Induktion von Mutationen durch Strahlung oder durch Applikation von chemischen Stoffen; 3) Versuche mit Nacktmäusen und 4) Gentechnische Manipulation des Mausgenoms. Sie werden im folgenden kurz beschrieben.

Die genetische Suszeptibilität von Mäusen für Karzinome basiert auf der spontanen Entwicklung von Tumoren ohne oder mit Behandlung exogener Stimuli. Ein bekanntes Beispiel für Lungenkarzinome im Tiermodell ist der Mausinzuchtstamm A. Lungentumore treten in diesem Stamm bei einigen Mäusen im Alter von 3-4 Wochen auf, nach 24 Monaten steigt der Anteil der Mäuse mit Lungentumoren auf nahezu 100% (Shimkin & Stoner, 1975)

Ein Maustumormodell für chemisch induzierte Hauttumore wurde von Balmain et al. (1984) beschrieben. Durch Behandlung der Mäuse mit DMBA, einem chemischem Karzinogen, das zu Mutationen des ras-Gens führt, und TPA Phorbolester kommt es zur Induktion von Hauttumoren.

Um den kausalen Zusammenhang zwischen Überexpression von Onkogenen oder Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen zu untersuchen, können Nacktmausexperimente und transgene Tiermodelle genutzt werden. In Nacktmausexperimenten werden transformierte Zellen in Nacktmäuse implantiert und das Tumorwachstum untersucht, dabei werden u.a. humane Tumorzellen (Pietras et al., 1998) und durch Onkogene oder Tumorsuppressorgene gezielt manipulierte NIH3T3-Zellen verwendet (Baasner et al., 1996). Für die Untersuchung der Tumorentwicklung in Organen ist die Herstellung transgener Tiere notwendig. Ein etabliertes Maustumormodell ist die RIP-Tag Maus (Hanahan, 1985). In dieser Maus wird das SV40 T Antigen unter der Kontrolle des Insulin-Promotors exprimiert. Transgene Mäuse entwickeln nach 12-14 Wochen Tumore in der Bauchspeicheldrüse ausgehend von den Inselzellen. Allerdings konnten Transformationen durch SV40 T Antigen in humanen Tumoren nicht nachgewiesen werden. Tiermodelle für Onkogene, die für humane Tumore relevant sind, wurden von Sandgren et al. (1989) beschrieben. Mäuse, die c-myc, c-Ha-ras oder beide Onkogene unter der Kontrolle des Albumin-Promotors exprimieren, wurden etabliert. Die Expression des c-myc Onkogens bewirkte die Entstehung von Lebertumoren nach 18 Monaten. c-Ha-ras transgene Mäuse, die eine hohe Transgenexpression aufwiesen starben im Alter von 1-3 Tagen an Leberhyperplasien. Mäuse mit geringerer Transgenexpression entwickelten nach 5 Monaten Lebertumore. Ein kooperativer Effekt der beiden Onkogene konnte in doppelt transgenen Tieren gezeigt werden, diese entwickelten nach einer verkürzten Latenzzeit (4 Monate) Lebertumore.

1.4 Aufgabenstellung

Die Etablierung neuer Tumorthapeutika ist erforderlich, da bisher nicht alle Tumorerkrankungen behandelt werden können und zum Teil Nebenwirkungen auftreten. IRF-1 ist ein Transkriptionsfaktor der tumorsuppressive Eigenschaften aufweist und somit ein potentiell Target für die Tumorthherapie darstellt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluierung der tumorsuppressiven Eigenschaften von IRF-1 als Target für eine Tumorthherapie. Dazu sollte ein Tumormodell entwickelt werden mit dem die Wirkung von IRF-1 charakterisiert werden kann und das in permanenten Zelllinien und transgenen Tieren eingesetzt werden kann. Zu einem späteren Zeitpunkt soll dieses Modell außerdem zur Validierung von Substanzen, die als Tumorthapeutika eingesetzt werden sollen, dienen.

Durch die Verwendung von regulierbaren Promotoren und Ligand-abhängig aktivierbarem IRF-1-hER Fusionsprotein sollte eine konditionale Transformation erreicht werden auf welche die Wirkung von IRF-1 quantitativ und zeitlich vorherbestimmbar untersucht werden kann. Dabei sollte die Wirkung von IRF-1 auf Zellkulturen charakterisiert werden, die durch verschiedene und kooperativ wirkende Onkogene transformiert wurden. Für die Untersuchungen *in vivo* sollte ein Maustumormodell etabliert werden, in dem die Wirkung von IRF-1 auf induzierbare gewebespezifische Tumore untersucht werden kann.

Nach der näheren Charakterisierung der tumorsuppressiven Wirkung von IRF-1 in permanenten Zelllinien sollte eine Reporterzelllinie für ein Hochdurchsatzscreening (HTS) etabliert werden, mit dem Substanzen, die zu einer Aktivierung oder Stimulation der IRF-1-Wirkung führen, identifiziert werden können. Durch zu etablierende Sekundärscreeningsysteme sollte die Spezifität und die Wirkebene dieser Substanzen näher charakterisierbar sein.

2 Ergebnisse

Die Evaluierung der tumorsuppressiven Wirkung von IRF-1 als Target für eine Tumorthherapie erfordert die nähere Charakterisierung der IRF-1-Wirkung *in vitro* und *in vivo*. Im Laufe der Arbeit wurde ein Modell entwickelt, das die Untersuchung der tumorsuppressiven Eigenschaften von IRF-1 *in vitro* auf transformierte Zellen ermöglicht, und die Übertragung des Modells auf transgene Tiere erlaubt. Voraussetzung für ein solches Modell ist die Etablierung eines Expressionssystems, das sowohl in permanenten Zelllinien als auch in transgenen Mäusen eingesetzt werden kann.

Aus Kenntnis der Wirkung von IRF-1 auf transformierte Zellen wurde ein Screeningsystem für HTS etabliert, das die Identifizierung und Charakterisierung von Substanzen ermöglicht, die die Wirkung von IRF-1 induzieren oder stimulieren.

2.1 Herstellung multicistronischer Expressionsvektoren

Für die Entwicklung des Modells zur Evaluierung der tumorsuppressiven Eigenschaften von IRF-1 als Target für eine Tumorthherapie wurden folgende Überlegungen aufgestellt: 1) Es soll nach Möglichkeit in permanenten Zelllinien und in transgenen Mäusen angewendet werden können und 2) Es soll auch zur Validierung von Substanzen als Tumortherapeutika eingesetzt werden können.

Voraussetzungen für ein solches Modell ist der Transfer verschiedener Gene. So muß neben Onkogenen zur Tumorinduktion und Reportergenen zum Nachweis der Transgenexpression zusätzlich der Tumorsuppressor IRF-1 transferiert werden. In *in vitro* Testsystemen wie permanenten Zelllinien ist der sukzessive Transfer mehrerer Gene unproblematisch und erfolgt über Kotransfektion oder durch mehrere voneinander unabhängige Gentransfers. Für die Untersuchungen in Organismen ist die Herstellung transgener Tiere erforderlich. Der DNA-Transfer erfolgt dabei meist durch direkte Injektion der DNA in die beiden Vorkerne einer befruchteten Eizelle. Dabei ist der Transfer verschiedener Plasmide zwar möglich, eine Integration aller Komponenten durch die geringe Integrationsrate allerdings unwahrscheinlich. Deshalb benutzt man die Kreuzung von Mäusen, welche die Gene

getrennt voneinander tragen. Ein sukzessiver Gentransfer durch Kreuzung ist aber zeit- und kostenintensiv. Bei voneinander unabhängigen Gentransfers muß man außerdem die Locus-abhängige Genexpression beachten. Integration in verschiedene Loci kann zu unterschiedlichen Expressionshöhen und Expressionsmustern führen. Um die Wirkung von IRF-1 auf transformierte Zellen zu untersuchen, müssen alle Gene in einer Zelle exprimiert werden. Ein gekoppelter Gentransfer sowie eine gekoppelte Genexpression ist daher von Vorteil.

Es gibt zwei verschiedene Möglichkeiten, mehrere Gene auf einem DNA-Fragment zu exprimieren: 1) Jedes Gen wird von einem unabhängigen Promotor exprimiert; 2) Die verschiedenen Gene werden als Teil einer polycistronischen mRNA durch die Verwendung von „Internal Ribosomal Entry Sites“ (IRES) exprimiert. Die Verwendung von internen Promotoren kann zu einer negativen Beeinflussung der Promotoren untereinander und somit zu einer Repression der Genexpression führen (Emerman & Temin, 1986). Bei der Verwendung von IRES-Elementen tritt dieses Problem nicht auf, da nur ein Promotor die Expression der verschiedenen Gene einer polycistronischen mRNA reguliert. Es wurde daher ein multicistronisches Expressionssystem entwickelt, bei dem die verschiedenen Gene durch IRES-Elemente verbunden sind. IRES-Elemente sind untranslatierte RNA-Sequenzen viralen, zellulären oder eukaryontischen Ursprungs, die eine cap-unabhängige Translation vermitteln (Jackson et al., 1990). Das in diesem Expressionssystem verwendete IRES-Element stammt aus der 5' untranslatierten Region des Polio Virus und wurde bereits in bicistronischen Vektorsystemen verwendet (Dirks et al., 1993).

Der Transfer mehrerer Gene auf einem DNA-Fragment ist aber nur eine Eigenschaft, die ein Expressionssystem für die Herstellung transgener Tiere aufweisen muß. Wichtige Eigenschaften sind außerdem die Möglichkeit zur Entfernung der prokaryontischen Sequenzen und die leichte Austauschbarkeit der Promotoren. DNA-Fragmente, die zur Generierung transgener Tiere verwendet werden, sollten keine prokaryontischen Sequenzen enthalten, da diese negative Einflüsse auf die Transgenexpression ausüben können. Außerdem können bei der Herstellung transgener Tiere unterschiedliche Anforderungen an die Expression der Gene gestellt werden, wie z.B. konstitutive, gewebespezifische oder induzierbare Expression. In dem Vektorsystem sollten daher geeignete Schnittstellen zur Verfügung stehen, die die Entfernung des prokaryontischen Vektorrückgrats und den leichten

Austausch der Promotorsequenzen ermöglichen. In den folgenden Kapiteln wird die Etablierung und die Funktionalität des multicistronischen Vektorsystems beschrieben.

2.1.1 Das Vektorsystem

Ausgehend von dem bicistronischen Expressionssystem von W. Dirks (Dirks et al. 1993, Dirks et al. 1994b), wurde ein multicistronisches Expressionssystem für permanente Zelllinien und transgene Tiere entwickelt.

Die Klonierungsstrategie dieses Vektorsystems beruht auf einem Kassettenaufbau. In einem Basisvektor (pVBC-3) werden nacheinander weitere Kassetten mit jeweils einem Gen und einem IRES-Element in Folge integriert. Dabei bleibt nach jedem Integrationsschritt eine singuläre NotI-Schnittstelle hinter dem letzten IRES-Element erhalten, die für den nächsten Integrationsschritt zur Verfügung steht. Zum Aufbau der Kassetten werden die verschiedenen Gene in den Hilfsvektor pVBC-2 integriert. Dieses System bietet mehrere Vorteile, so stehen zum einen trotz hoher Größen bei multicistronischen Vektoren für die Klonierungen der Einzelfragmente im Hilfsvektor singuläre Schnittstellen zur Verfügung. Zum anderen ermöglicht das System die schnelle Kombination verschiedener Kassetten.

Im folgendem wird der Basisvektor pVBC-3 ausgehend vom Promotor in 3'-Richtung beschrieben. Die Promotorsequenz wird durch die Schnittstellen ClaI und XhoI flankiert. Dies ermöglicht den einfachen Austausch des Promotors. Für dieses System stehen konstitutive Promotoren (CMV, SV40), induzierbare Promotoren (tTA, bidirektionaler tTA) (Gossen & Bujard, 1992; Baron et al., 1995) und ein Hybridpromotor (MT7) (Dirks et al., 1994a) mit passenden Schnittstellen zur Verfügung. Hinter der „Multi Cloning Site“ (MCS) befindet sich ein IRES-Element, das von einer singulären NotI Schnittstelle begrenzt wird. In diese NotI-Schnittstelle wird die nächste Kasette aus dem Hilfsvektor integriert. Anschließend folgt ein PolyA-Signal von SV40. Zur Amplifizierung und Selektion in *E.coli* befinden sich prokaryontische Sequenzen für einen Replikationsstart und ein Ampicillinresistenzgen auf dem Vektor.

Einigen Schnittstellen kommen neben den schon erwähnten besonder Funktionen zu. Diese werden im folgenden näher erläutert. Bei der Verwendung des bidirektionalen tTA-Promotors (Baron et al., 1995), können vorher klonierte Kassetten mit zwei PmeI-Schnittstellen (vor der MCS und hinter dem PolyA-Signal) ausgeschnitten und in die 5'

vom Promotor liegende *Swa*I-Schnittstelle integriert werden. Zur Entfernung der prokaryontischen Sequenzen können in diesem Fall zwei *Pac*I-Schnittstellen verwendet werden, die jeweils hinter den beiden PolyA-Signalen liegen. Bei der Nutzung der anderen Promotoren dienen *Swa*I und *Pac*I zum Entfernen der prokaryontischen Sequenzen.

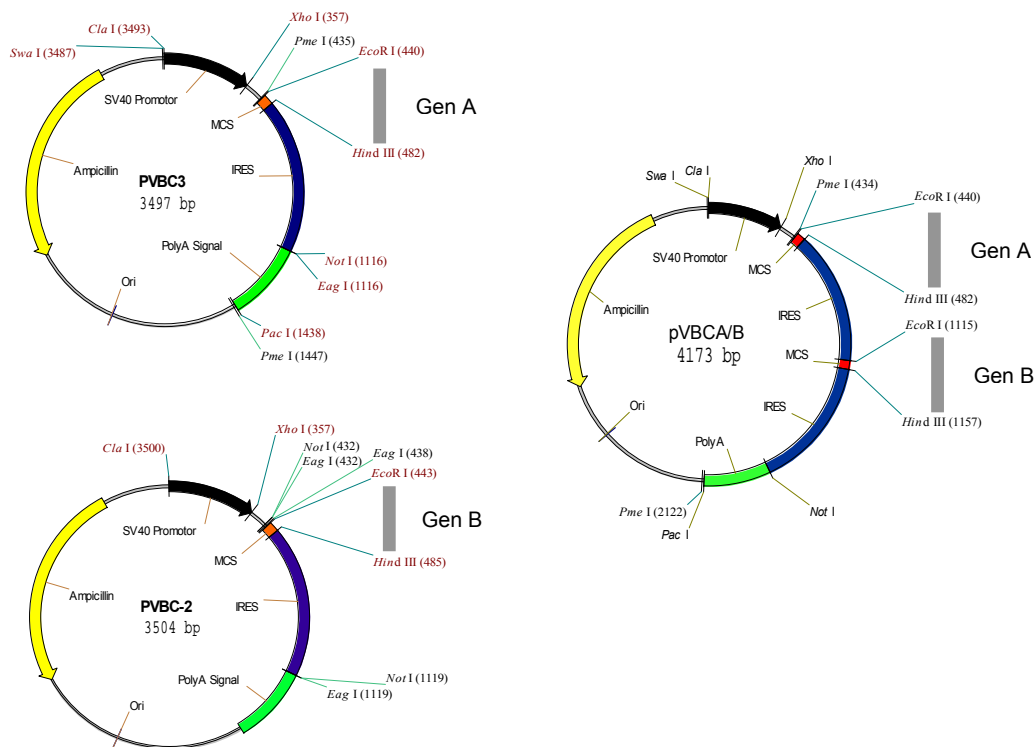


Abb. 2.1 Das Vektorsystem

Plasmidkarten von pVBC-3, pVBC-2 und einem daraus resultierenden bicistronischen Vektor (pVBCA/B). Gen A wird in die MCS von pVBC-3 inseriert, Gen B in die MCS des Hilfsvektors pVBC-2. Durch Restriktionsverdau mit *Eag*I kann Gen B und das IRES-Element aus pVBC-2 in den *Not*I geöffneten pVBC-3 inseriert werden. Dabei bleibt eine einfache *Not*I-Schnittstelle 3' vom letzten IRES-Element erhalten und steht für nachfolgende Klonierungen zur Verfügung. Erklärungen der weiteren wichtigen Schnittstellen im Text. Ori: prokaryontischer Replikationsstart; Ampicillin: Ampicillin-Resistenzgen; MCS: „Multiple Cloning Site“; IRES: IRES von Polio Virus; PolyA: PolyA-Signal von SV40.

Der Hilfsvektor zur Herstellung der einzelnen Genkassetten unterscheidet sich nur geringfügig von dem Basisvektor. Die *Pme*I-Schnittstelle vor der MCS wurde durch eine *Eag*I-Schnittstelle ausgetauscht. *Eag*I erkennt die inneren sechs Basen der „Core-Sequenz“ von *Not*I, so daß eine Kasette aus Gen und IRES-Element mit *Eag*I aus dem Hilfsvektor ausgeschnitten und in die *Not*I Schnittstelle des Basisvektors integriert werden kann. Die Um-

gebung der EagI-Schnittstellen sind so ausgesucht, das nach Integration der Kassette in den Vektor die 5'NotI-Schnittstelle zerstört wird, während die 3'NotI-Schnittstelle erhalten bleibt und für die nächste Klonierung zur Verfügung steht.

2.1.2 Funktionalität des polycistronischen Vektorsystems

Die Verwendung eines multicistronischen Vektorsystems führt zur Transkription einer mRNA, auf der die verschiedenen Gene durch IRES-Elemente verbunden sind und von einer mRNA translatiert werden. Bei der Anwendung eines so komplexen Expressionssystems ist es notwendig, die Funktionalität näher zu untersuchen. Zwar geht man davon aus, daß die cap-unabhängige Translationsinitiation nicht von der Anzahl der Cistronen abhängt, allerdings wurde eine Verringerung der Expression um den Faktor drei bei der Polio-IRES-vermittelten, cap-unabhängigen Translation beobachtet (Macejak & Sarnow, 1991; Dirks et al., 1994b). Ursachen für eine geringere Expression von Genen auf multicistronischen Expressionseinheiten können eine verringerte mRNA-Stabilität und eine Beeinflussung der cap-unabhängigen Translation sein. Die Instabilität der mRNAs kann verschiedene Ursachen haben, so können längere mRNAs eine geringere Halbwertszeit aufweisen und einige Gene die Stabilität der mRNAs negativ beeinflussen (Byun et al., 1998). Zusätzlich kann die Position der Gene auf der mRNA eine wichtige Rolle spielen (Dirks et al., 1994b; Byun et al., 1998). Um die Funktionalität des Vektorsystems zu überprüfen, sollten Vollständigkeit und Stabilität der mRNA sowie die Expression von verschiedenen Konstrukten näher charakterisiert werden.

Konstrukte mit einem, zwei und drei Cistronen wurden hergestellt und getestet. Im letzten Cistron der Konstrukte ist jeweils das Reportergen „Sekretierte Alkaline Phosphatase“ (SEAP) lokalisiert (Berger et al., 1988). SEAP wird in das Kulturmedium sekretiert und kann in diesem, mit Hilfe eines enzymatischen Testes, quantitativ nachgewiesen werden. Die Menge des nachgewiesenen Reporterproteins korreliert mit der Translationseffizienz. Die in Abb. 2.2 A dargestellten Konstrukte wurden transient in NIH3T3-Zellen transfiziert, die Reportergenexpression der verschiedenen Konstrukte gemessen (Abb. 2.2 B) und die Stabilität der mRNAs mit Hilfe eines Northern Blots analysiert (Abb. 2.2 C).

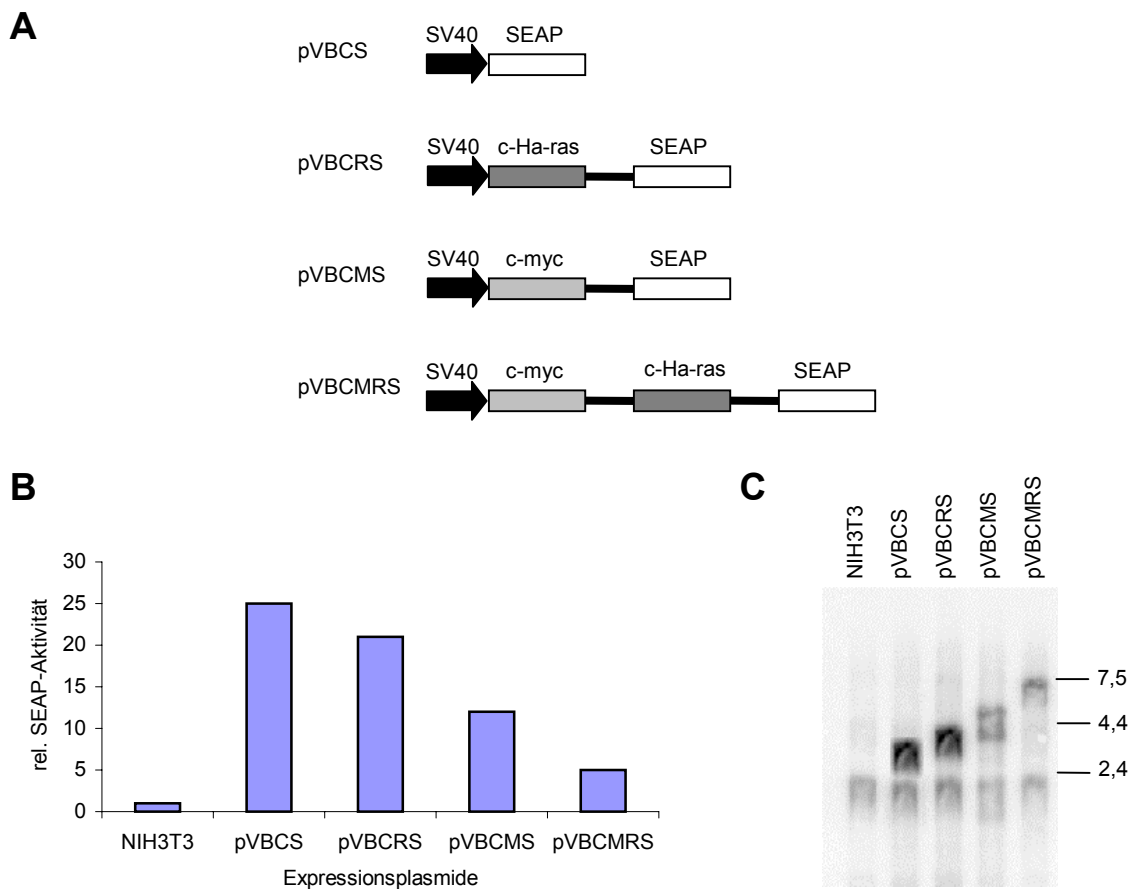


Abb. 2.2 Funktionalität des Vektorsystems

A: Schematische Darstellung der Konstrukte. pVBCS: Expressionsvektor für SEAP; pVBCRS: Expressionsvektor für c-Ha-ras und SEAP; pVBCMS: Expressionsvektor für c-myc und SEAP; pVBCMRS: Expressionsvektor für c-myc, c-Ha-ras und SEAP. SV40: SV40 Promotor; schwarzer Balken: IRES-Element von Polio Virus. B/C: NIH3T3-Zellen wurden mit den in A beschriebenen Konstrukten und einem Luziferase-Expressionsplasmid transient transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurde die SEAP-Aktivität bestimmt und die Transfektionseffizienz mittels Luziferase abgeglichen. Zusätzlich wurde die mRNA der Zellen isoliert. B: SEAP-Aktivität. Die SEAP-Aktivität nicht transfizierter Zellen wurde gleich 1 gesetzt. C: Northern Blot-Analyse. Die mRNA der Zellen wurde in einem Agarose-Gel aufgetrennt und der Blot mit einer EcoRI/HindIII c-myc-Sonde und einer SmaI Luziferase-Sonde hybridisiert.

Die SEAP-Expression von Zellen, die mit den Konstrukten pVBCS und pVBCRS transfiziert wurden (25fach, 21fach), ist gegenüber Zellen, die mit den Konstrukten pVBCMS und pVBCMRS transfiziert wurden (12fach, 5fach), deutlich höher. Die Northern Blot-Analyse der Zellen zeigt die erwarteten mRNAs mit den Größen 2,8 kbp (pVBCS), 4,2 kbp (pVBCRS), 4,5 kbp (pVBCMS) und 6,5 kbp (pVBCMRS). Durch die unterschiedlichen Längen der mRNAs kann die exakte Menge nicht ermittelt werden. Trotzdem macht der Northern Blot deutlich, daß mehr mRNA von den Konstrukten pVBCS und pVBCRS vor-

handen ist. Die Menge der mRNAs korreliert so mit der Expressionshöhe. Die Ergebnisse zeigen, daß die mehrcistronische Expression mit dem Vektorsystem funktionell ist. Allerdings kommt es bei einigen Konstrukten durch eine geringere Stabilität der mRNAs zu geringeren Expressionshöhen. Der Unterschied in der Expressionshöhe zwischen den Konstrukten pVBCRS und pVBCMS zeigt, daß nicht nur die Länge der mRNAs sondern auch die einzelnen Gene einen Einfluß auf Expressionshöhe bzw. mRNA-Stabilität haben.

2.2 Tumorsuppressive Eigenschaften von IRF-1 *in vitro*

Tumorsuppressorgene sind Gene, die durch den Verlust ihrer Funktion an der Entwicklung von Tumoren beitragen. Der Funktionsverlust kann durch verschiedene Ursachen hervorgerufen werden: Rearrangements des chromosomalen Bereichs, auf dem das Tumorsuppressorgen lokalisiert ist, oder Mutationen des Gens. Charakterisiert werden Tumorsuppressorgene durch verschiedene Merkmale: 1) Assoziation von Deletionen im chromosomalen Bereich des Gens mit Tumoren 2) Verhinderung der *in vitro*-Onkogenese durch Überexpression des Tumorsuppressorgens 3) Erhöhung der Tumorinzidenz in Tumorsuppressor-„knock out“-Mäusen.

IRF-1 weist tumorsuppressive Eigenschaften auf. So sind Deletionen des chromosomalen Bereichs, auf dem das IRF-1-Gen lokalisiert ist, und durch Spleiß-Fehler entstandenes funktionsloses IRF-1 häufig mit Leukämien assoziiert (Willman et al., 1993; Harada et al., 1994b). IRF-1 ist außerdem in der Lage, die *in vitro*-Transformation von Zellen durch verschiedenen Onkogene zu unterdrücken (Tanaka et al., 1994b; Harada et al., 1993) und die Tumorbildung von Sarkomzelllinien in Nacktmäusen zu verhindern (Yim et al., 1997). Allerdings zeigen IRF-1-„knock out“-Mäuse keine erhöhte Tumorinzidenz. Auf Grund dieser Ergebnisse sollten die tumorsuppressiven Eigenschaften von IRF-1 näher untersucht werden. Ziel der in diesem Abschnitt beschriebenen Arbeit war die Etablierung eines Tumormodells, mit dem die tumorsuppressiven Eigenschaften von IRF-1 näher untersucht werden können. Die Eigenschaften von IRF-1 sollten dabei zunächst *in vitro* charakterisiert und anschließend auf ein Mausmodell übertragen werden.

2.2.1 Das Testsystem und die Funktionalität der Konstrukte

Für die nähere Charakterisierung der tumorsuppressiven Eigenschaften von IRF-1 sollte ein Tumormodell entwickelt werden, das sowohl für *in vitro* als auch für *in vivo* Untersuchungen eingesetzt werden kann. Voraussetzungen für die Übertragbarkeit eines solchen Modells ist die Auswahl geeigneter Komponenten: Vektorsystem, Promotor, Onkogene, Tumorsuppressoren und Reportergene müssen in beiden Systemen einsetzbar sein.

Für die Entwicklung des Tumormodells wurde das in 2.1.1 beschriebene Vektorsystem verwendet. Durch die Möglichkeiten des Entfernens prokaryontischer Sequenzen, des Transfers mehrerer Gene auf einem DNA-Fragment und des leichten Austauschs der Promotorsequenzen ist das System für beide Anwendungen geeignet.

Die Expression der Gene muß sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gewährleistet sein. Nicht alle Promotoren sind für beide Systeme geeignet. Außerdem schien der Einsatz eines regulierbaren Promotors sinnvoll, da es durch konstitutive Expression von Onkogenen zu einer schnelleren Akkumulation von weiteren, unerwünschten Mutationen kommen kann. Ein weiterer Vorteil der regulierten Expression ist die Möglichkeit, die Unterschiede zwischen Onkogen exprimierenden und nichtexprimierenden Zellen in der selben Zelllinie zu untersuchen. Ein sehr effizientes und gut etabliertes System stellt das von Gossen und Bujard (1992) etablierte Konzept des Tetrazyklin-abhängigen „tet-off“-Systems dar. Es basiert auf den regulatorischen Elementen des Tn10 Tetrazyklin-Resistenz-Operons aus *E.coli* und nutzt die Eigenschaften eines Repressorproteins (tetR) in Abwesenheit von Tetrazyklin an spezifische Tetrazyklin-Operator-Sequenzen (tetO) zu binden. Tetrazyklin bindet an das Repressorprotein und verhindert durch Konformationsänderung die DNA-Bindung. Das Repressorprotein wird in Mammalia-Zellen als Fusionsprotein mit der Genaktivierungsdomäne VP16 exprimiert, so daß in Abwesenheit von Tetrazyklin nach DNA-Bindung eine Aktivierung des Tetrazyklin-abhängigen Promotors erfolgt. Da das System aus *E.coli* stammt, sind Wechselwirkungen und unspezifische Aktivierungen von eukaryontischen Sequenzen unwahrscheinlich. Für die Reprimierung der Promotoraktivität wird in den folgenden Versuchen das Tetrazyklin-Analogon Doxzyzyklin verwendet. Im Gegensatz zu Tetrazyklin zeigt dieses eine höhere Affinität zum Transaktivator und erniedrigt so die Transaktivierungs-Aktivität stärker als Tetrazyklin. Allerdings weist Doxzyzyklin eine längere Halbwertszeit als Tetrazyklin auf, so daß eine schnelle Geninduktion nicht möglich ist (Mo-

hammad et al., 1997). Von Baron et al. (1995) wurde ein Promotor entwickelt, der auf beiden Seiten der tetO-Sequenzen einen minimalen CMV-Promotor besitzt. Dies ermöglicht die regulierte Expression von Genen auf beiden Seiten des Promotors. Für das Tumormodell wurde dieser Promotor gewählt, da neben der regulierten Expression die Expression zweier mRNAs unter demselben Promotor möglich ist.

Onkogene werden in verschiedene Klassen eingeteilt. Für die Untersuchungen, ob IRF-1 die Transformation von Zellen durch Onkogene der verschiedenen Klassen revertieren kann, wurden das HER2-Onkogen aus der Klasse der Proteinkinasen und Wachstumsfaktoren, das c-Ha-ras-Onkogen aus der Klasse der zytoplasmatischen und GTP-bindenden Proteine sowie das c-myc-Onkogen aus der Klasse der nukleären Onkogene ausgesucht. HER2/erbB2/c-neu gehört zur „Human Epidermal Growth Factor Rezeptor“ Familie (HER) der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (Ullrich & Schlessinger, 1990). Die Überexpression von HER2 führt zu humanen Adenokarzinomen (Salmon et al., 1987; 1989; Hynes et al., 1993). c-Ha-ras ist ein GTP-bindendes Protein, das zur Aktivierung der MAP-Kinasen und schließlich zur Induktion von fosB und c-myc führt. Ras-Gene gehören zu den in humanen Tumoren am häufigsten mutierten Onkogenen (Bos, 1989). c-myc ist ein nukleärer Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus spielt. Deregulation der c-myc-Expression als Konsequenz genetischer Rearrangements ist mit verschiedenen Neoplasien assoziiert (Amati & Land, 1994; Henrikson & Lüscher, 1996). Nach der „Multi step“-Theorie der Karzinogenese (1.3.2) werden mehrere Mutationen in Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen, die kooperativ wirken, für die Entwicklung von Tumoren benötigt. Für die Untersuchungen, ob IRF-1 in der Lage ist, den tumorigenen Phänotyp von mehrfach transformierten Zellen zu revertieren, wurden die Onkogene c-myc und c-Ha-ras ausgesucht. Diese beiden Onkogene wirken *in vitro* und *in vivo* kooperativ (Sinn et al., 1987; Sandgren et al., 1989).

Die Überexpression von IRF-1 führt zur Inhibition der Proliferation (Kirchhoff et al., 1993). Die Herstellung stabiler IRF-1-exprimierender Zellen ist wegen dieser negativen Wachstumseffekte nicht möglich. Durch die Anwendung eines Fusionsproteins aus IRF-1 und dem Hormon-bindenden Teil des humanen Östrogenrezeptors (hER) kann die IRF-1 Aktivität Ligand-abhängig graduell reguliert werden (Kirchhoff et al., 1993). In Abwesenheit von Rezeptoragonisten liegt das Fusionsprotein inaktiv in der Zelle vor, nach Aktivie-

nung durch Östradiol kommt es zur transkriptionellen Aktivierung von ISGs und zur Inhibition der Zellproliferation (Kirchhoff et al., 1993). Im hier beschriebenen Tumormodell soll die Expression des IRF-1-hER-Fusionsproteins durch den Tetrazyklin-abhängigen Promotor reguliert werden. Die Kombination von regulierter Genexpression und regulierter IRF-1-Aktivität erlaubt sowohl die Untersuchung der Onkogen-Wirkung in An- und Abwesenheit von aktivem IRF-1 in derselben Zelllinie, als auch die zeitlich und quantitativ abgestufte Aktivierung von IRF-1 während der Onkogenexpression.

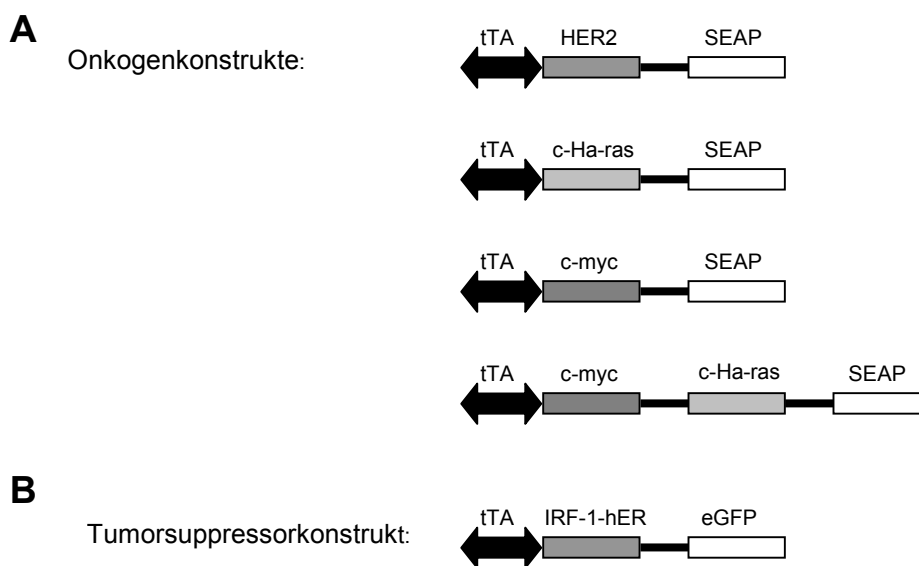


Abb. 2.3 Schematische Darstellung der Onkogenkonstrukte und des Tumorsuppressorkonstrukts

Darstellung der mehrcistronischen Expressionskonstrukte. A: Die Onkogene werden unter der Kontrolle des bidirektionalen tTA-Promotors exprimiert. Für die Überprüfung der Transgenexpression wird das Reportergen SEAP jeweils im letzten Cistron exprimiert. B: Der Tumorsuppressor IRF-1 wird als Östradiol-regulierbares IRF-1-hER Fusionsprotein unter der Kontrolle des bidirektionalen tTA-Promotors exprimiert. Zur Überprüfung der Expression wird das Reportergen eGFP im 2. Cistron exprimiert. Schwarze Balken: IRES-Element von Polio Virus.

Um die Expression der verschiedenen Gene in Gewebeflüssigkeit und den Zellen selbst nachzuweisen, sollten Reportergene im jeweils letzten Cistron exprimiert werden. Die Funktionalität des letzten Cistron einer polycistronischen mRNA weist auf die Vollständigkeit der mRNA und die Expression aller Gene dieser mRNA hin. Dabei bietet die Expression von Reportergenen, die in lebenden Zellen nachgewiesen werden können, den

Vorteil, daß die Genexpression während der Versuche verfolgt werden kann, ohne die Zellen zu töten. Für einen Nachweis der Expression in lebenden Zellen sind die Reportergene „Green Fluoreszens Protein“ (GFP) und „Sekretierte Alkaline Phosphatase“ (SEAP) am besten geeignet. Beide Reportergene lassen sich in lebenden Zellen nachweisen und sind auch für *in vivo*-Anwendungen geeignet (Baasner et al., 1996; Oktabe et al., 1997).

Die hergestellten Konstrukte sind in Abb. 2.3 dargestellt. Auf Grund der Komplexität der Konstrukte mußte die Funktionalität der einzelnen Gene überprüft werden. Dabei ist die genaue Analyse der Genexpression im komplexesten Konstrukt ausreichend, da durch den Aufbau im Kassettensystem (2.1.1) immer die selben Kassetten in den verschiedenen Konstrukten benutzt werden. Das in Abb. 2.4 A dargestellte Konstrukt mit dem bidirektionalen Tetrazyklin-abhängigen Promotor, der auf der 5'-Seite die Transkription einer tricistronischen DNA mit den Genen c-myc, c-Ha-ras und SEAP reguliert und auf der 3'-Seite die Transkription einer bicistronischen DNA mit den Genen IRF-1-hER und eGFP reguliert, wurde stabil in Zellen integriert, die den Transaktivator stabil exprimieren (NIH3T3TA). Die erhaltene Zelllinie heißt 35/7-20. Die Funktionalität der Konstrukte wurde auf RNA- und Proteinebene untersucht. Die Analyse der gebildeten mRNAs ergab die erwarteten zwei mRNAs mit den Größen 4,0 kbp und 6,6 kbp (Abb. 2.4 B). Die Expression der Gene IRF-1-hER, c-myc und c-Ha-ras wurde mit Hilfe von Westernblots nachgewiesen. Abb. 2.4 C zeigt die Expression der Gene in Abhängigkeit von der Promotoraktivität. Die Aktivität der Reportergene eGFP und SEAP wurde lichtmikroskopisch bzw. mit Hilfe eines enzymatischen Assays nachgewiesen. Abb. 2.4 E zeigt fluoreszierende, GFP-exprimierende Zellen, Abb. 2.4 D die SEAP-Aktivität von Zellen bei aktiviertem bzw. reprimiertem Promotor. Die Analyse des Konstruktes ergab die Bildung beider mRNAs und die Expression aller Gene. Das Konstrukt ist somit funktionell und kann für die verschiedenen Versuche eingesetzt werden.

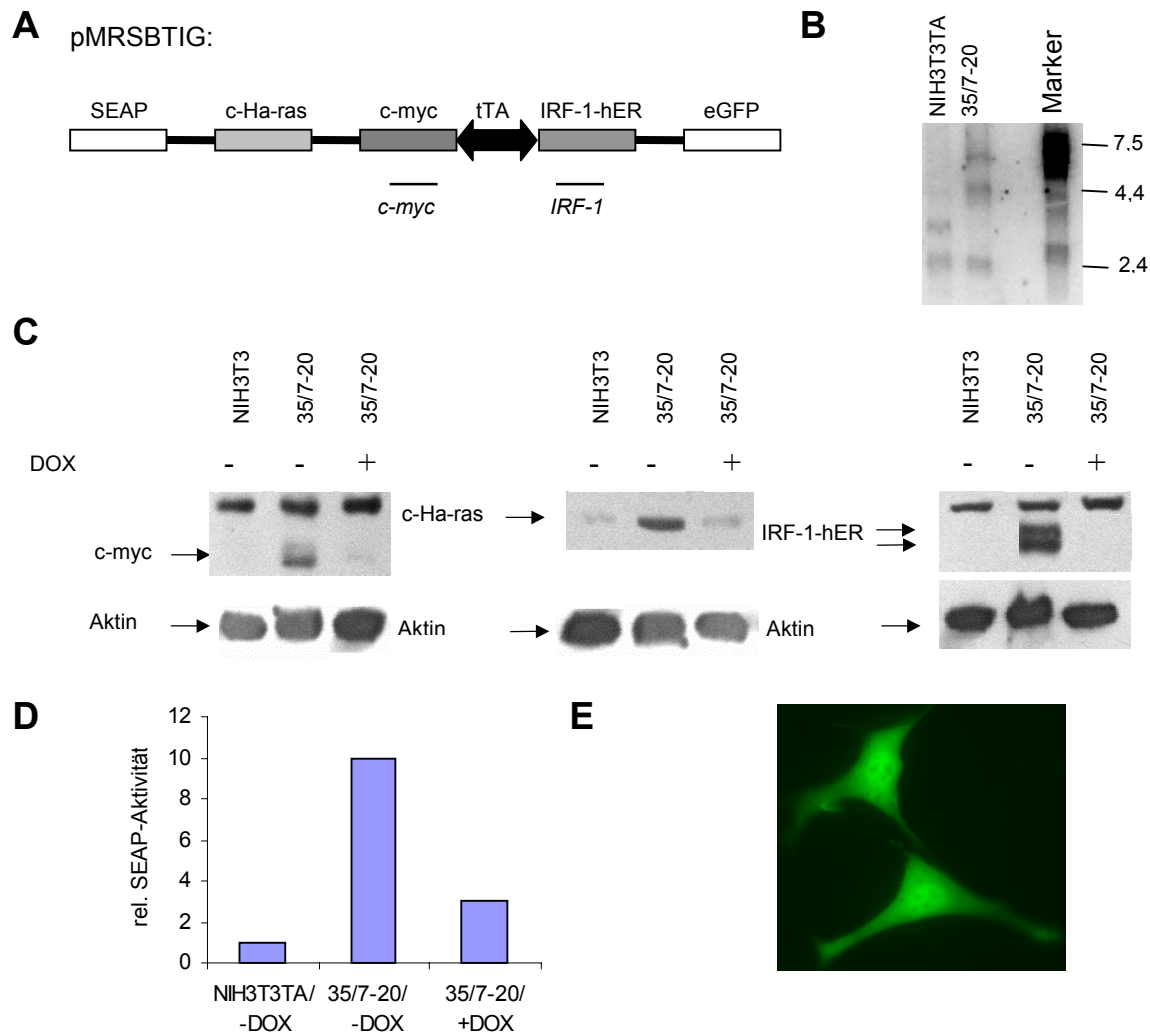


Abb. 2.4 Funktionalität des Konstruktes pMRSBTIG

A: Schematische Darstellung des Konstruktes pMRSBTIG. Die Onkogene c-myc und c-Ha-ras und das Reporter-gen SEAP sind auf der linken Seite des bidirektionalen tTA-Promotors eingezeichnet, das IRF-1-hER Fusionsprotein und das Reporter-gen eGFP auf der rechten Seite. Schwarzer Balken: IRES-Element von Polio Virus; schwarze Striche: Sonden, die für den Northern Blot verwendet wurden. B: Northern Blot-Analyse von NIH3T3TA-Zellen und NIH3T3TA-Zellen, die pMRSBTIG stabil exprimieren (35/7-20). Sukzessive Hybridisierung mit einer c-myc- und einer IRF-1-Sonde führen zu Signalen bei 2,2 kbp (endogenes IRF-1), 2,9 kbp (endogenes c-myc;), 4,0 kbp (IRF-1-hER/eGFP) und 6,6 kbp (c-myc/H-ras/SEAP). Die Transkription des endogenen c-myc scheint durch die Transkription von pMRSBTIG reprimiert zu sein. C: Western Blot zum Nachweis der c-myc-, c-Ha-ras- und IRF-1-hER-Expression. NIH3T3TA-Zellen und NIH3T3TA-Zellen, die pMRSBTIG stabil exprimieren (35/7-20), wurden ausgesät und die Promotoraktivität durch das Absetzen von Doxycyclin induziert. Das c-myc-Protein wurde mit Hilfe eines monoklonalen Maus-Antikörpers nachgewiesen, c-Ha-ras mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper und IRF-1-hER mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen hER. Als sekundärer Antikörper dienten Peroxidase gekoppelte Schaf-Antikörper. D: Nachweis der SEAP-Aktivität. NIH3T3TA- und 35/7-20-Zellen wurden ausgesät und die Geninduktion durch das Absetzen von Doxycyclin induziert. Nach 48 Stunden wurde die SEAP-Aktivität gemessen. Die SEAP-Aktivität unbehandelter Zellen wurde gleich 1 gesetzt. E: Die eGFP-Expression in lebenden 35/7-20-Zellen wurde lichtmikroskopisch über die Fluoreszenz-Emission des Proteins nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 450-490 nm nachgewiesen. Die Zellen wurden in einer Vergrößerung von 630-fach fotografiert.

2.2.2 IRF-1 revertiert den transformierten Phänotyp

Wichtige *in vitro* Kriterien für einen malignen Phänotyp sind substratunabhängiges Wachstum und fehlende Kontaktinhibition. Zusätzlich benötigen transformierte Zellen weniger Wachstumsfaktoren und zeigen eine fehlende Zellalterung (Immortalisierung). NIH3T3-Zellen weisen bereits einige Eigenschaften transformierter Zellen auf. Sie sind immortalisiert, wachsen aber substratabhängig und kontaktinhibiert. Der Transfer eines Onkogens bewirkt substratunabhängiges Wachstum der NIH3T3-Zellen. Substratunabhängiges Wachstum ermöglicht die Bildung von Klonen in Weichagar, während nicht transformierte, substratabhängig wachsende Zellen diese Eigenschaft nicht aufweisen. Um zu untersuchen, ob IRF-1 den tumorigenen Phänotyp von transformierten Zellen revertieren kann, wurde die Fähigkeit der Zellen untersucht, in An- oder Abwesenheit von IRF-1 Klone in Weichagar zu bilden.

Stabile Zelllinien, die die in Abb. 2.3 dargestellten Onkogenkonstrukte und jeweils das Tumorsuppressorkonstrukt exprimieren, wurden in Weichagarklonierungen getestet. Jeweils 1×10^3 Zellen wurden in Agar kultiviert und die Genexpression bzw. Aktivierung durch das Absetzen von Doxyzyklin und die Zugabe von Östradiol induziert. Die Anzahl der Weichagarklone wurde nach sieben Tagen bestimmt.

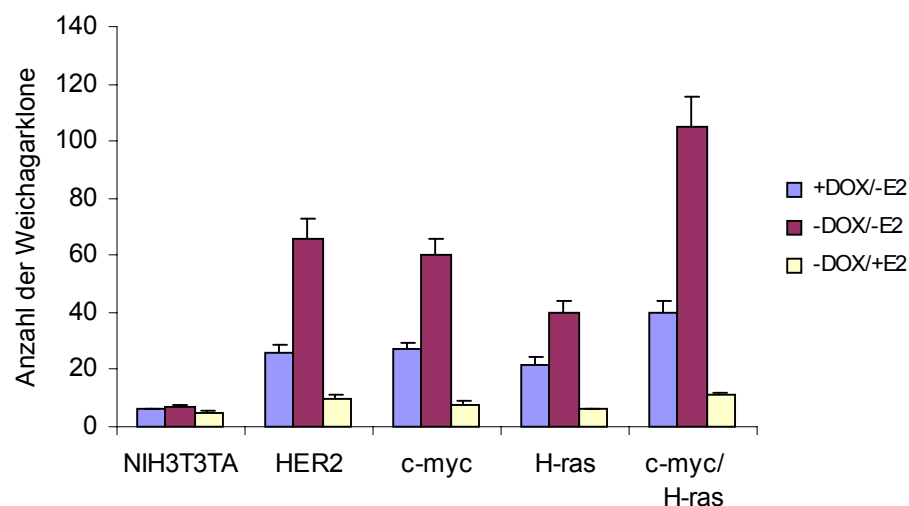


Abb. 2.5 Einfluß von IRF-1 auf die Bildung von Weichagarklonen transformierter Zellen

NIH3T3TA-Zellen, die die Onkogene HER2, c-myc und c-Ha-ras und das IRF-1-hER Fusionsprotein unter der Kontrolle des tTA-Promotors stabil exprimieren bzw. nicht transfizierte Ausgangszellen, wurden in 0,3 %igem Agar ausgesät und in An- oder Abwesenheit von Doxyzyklin bzw. Östradiol kultiviert. Die Anzahl der makroskopisch detektierbaren Klone wurde nach 7 Tagen bestimmt.

NIH3T3TA-Zellen, die durch die Abwesenheit von Doxyzyklin die verschiedenen Onkogene exprimieren, bilden Weichagarklone. Die Anzahl und Größe der Weichagarklone der durch die Expression der beiden Onkogene c-myc und c-Ha-ras transformierten Zellen, ist gegenüber den einfach transformierten Zellen deutlich erhöht. Die Expression von zwei kooperativ wirkenden Onkogenen (c-myc/c-Ha-ras) erhöht den Wachstumsvorteil der Zellen. In Zellen, in denen durch Zugabe von Östradiol zusätzlich das IRF-1-hER Fusionsprotein aktiviert wurde, wird die Ausbildung von Weichagarklonen verhindert. IRF-1 ist somit nicht nur in der Lage den tumorigenen Phänotyp von Zellen zu revertieren, die durch nukleäre Onkogene (c-myc, fosB) transformiert wurden, sondern kann diese Wirkung auch auf Zellen ausüben, die durch Onkogene anderer Klassen transformiert wurden. Zusätzlich kann IRF-1 diese Wirkung auf Zellen ausüben, die durch zwei kooperativ wirkende Onkogene transformiert wurden. In Anwesenheit von Doxyzyklin kommt es in allen transformierten Zelllinien zur Bildung von Weichagarklonen. Die Anzahl der Klone ist aber geringer als in der Abwesenheit von Doxyzyklin. Dies ließ vermuten, daß die Tetrazyklin-abhängigen Promotoren in Anwesenheit von Doxyzyklin nicht vollständig reprimiert waren. Die Messung der Aktivität des Reportergens SEAP, das als jeweils letztes Cistron der Onkogenkonstrukte exprimiert wird (Abb. 2.3), bestätigte diese Vermutung (Daten nicht gezeigt).

2.2.2.1 Autoregulatorische Kassette

Die unvollständige Repression des Tetrazyklin-reprimierbaren Promotors kann verschiedene Ursachen haben. Die Expression eines im Genom höherer Zellen integrierten Transgens ist von mehreren Parametern abhängig. So beeinflusst die chromosomale Umgebung sowohl Höhe als auch Stabilität der Expression (Walters et al., 1996). Transgene können in transkriptionell aktive Loci integrieren, was zu einer Aktivierung des integrierten Transgens führt. Eine Repression von regulierbaren Promotoren ist in diesen Loci unwahrscheinlich. Zusätzlich können sich mehrere Kopien eines Transgens, die hintereinander in demselben Locus integriert sind, gegenseitig beeinflussen und eine Regulation verhindern (Garrick et al., 1998). Ein weiterer Aspekt ist die Expression des Transaktivators, der für die Regulation des Tetrazyklin-abhängigen Promotors verantwortlich ist. Eine hohe Ex-

pression des Transaktivators könnte zu einer unvollständigen Repression des Promotors führen, wenn nicht alle Transaktivatormoleküle von Doxyzyklin gebunden werden.

Im Verlauf der Arbeit wurde eine Strategie entwickelt, um die unspezifische Aktivität des Tetrazyklin-abhängigen Promotors zu unterdrücken. Mit Hilfe einer autoregulierbaren Kasette sollte die Expression des Transaktivators selbst reguliert werden. Folgende Überlegungen wurden angestellt: die Expression des Transaktivators wurde unter die Kontrolle des Tetrazyklin-abhängigen Promotors gestellt. In Abwesenheit von Doxyzyklin kommt es zu einer autokrinen Stimulation der Transaktivatorexpression und zur Aktivierung anderer Tetrazyklin-abhängiger Promotoren. Durch Zugabe von Doxyzyklin wird neben der Aktivität des Transaktivators indirekt auch die Expression des Transaktivators reprimiert. Als Folge sinkt die Transaktivator-Konzentration, die Reprimierung aller Transaktivatormoleküle durch Doxyzyklin wird wahrscheinlicher.

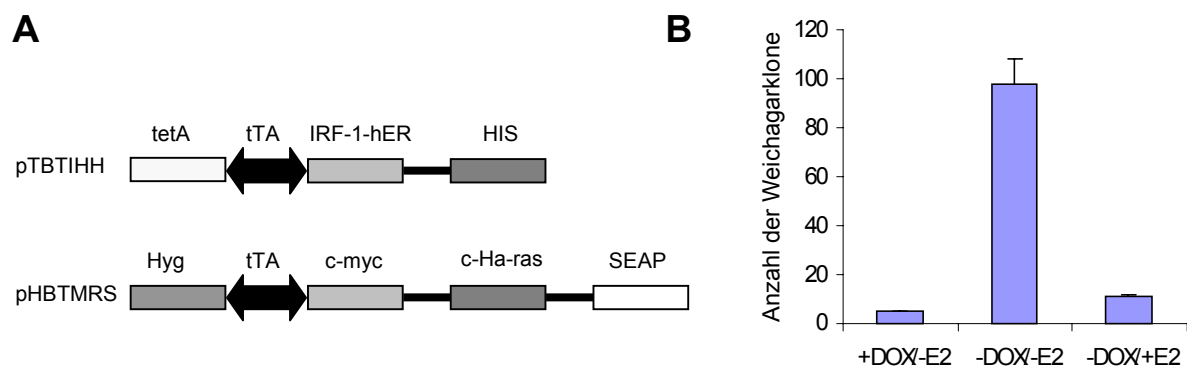


Abb. 2.6 Autoregulierte Expression

A: Schematische Darstellung der Konstrukte pTBTIHH und pHBTMRS. Der Transaktivator und alle anderen Gene werden unter der Kontrolle bidirektionalen Promotors exprimiert. tetA: Transaktivator; tTA: bidirektionaler tTA-Promotor; HIS: Histidinol-Resistenzgen; Hyg: Hygromycin-Resistenzgen; schwarze Balken: IRES-Element von Polio Virus. B: NIH3T3-Zellen, die stabil pTBTIHH und pHBTMRS exprimieren, wurden in 0,3 %igen Agar ausgesät und in An- oder Abwesenheit von Doxyzyklin (DOX) bzw. Östradiol (E) kultiviert. Die Anzahl der makroskopisch detektierbaren Klone wurde nach 7 Tagen bestimmt.

Zellen, die die Onkogene c-myc und c-Ha-ras, den Tumorsuppressor IRF-1 und den Transaktivator unter der Kontrolle des Tetrazyklin-reprimierbaren Promotors stabil exprimieren (Abb. 2.6 A), wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, Klone in Weichagar zu bilden (Abb. 2.6 B). In Anwesenheit von Doxyzyklin wurde die Ausbildung von Weichagarklonen verhindert, eine vollständige Repression des Promotors konnte erreicht werden. Durch Be-

stimmung der SEAP-Aktivität, die in Anwesenheit von Doxzyklin nicht nachweisbar war (Daten nicht gezeigt), konnte die Beobachtung bestätigt werden. Die Abwesenheit von Doxzyklin führt zur Aktivierung der Onkogenexpression und zur Ausbildung von Weichagarklonen, die durch simultane Aktivierung des IRF-1 Fusionsproteins verhindert werden konnte. Eine vollständige Repression des Tetrazyklin-abhängigen Promotors ist durch die Regulation der Transaktivatorexpression gelungen.

2.2.3 IRF-1 inhibiert das Zellwachstum transformierter Zellen

Neben der Induktion von Interferonen (Reis et al., 1992; Kirchhoff et al., 1993) bewirkt IRF-1 auch eine Proliferationsinhibition (Kirchhoff et al., 1995). Diese ist unabhängig von der durch Interferone induzierten Proliferationsinhibition (Kirchhoff et al., 1995). Die Fähigkeit von IRF-1, das Wachstum transformierter Zellen zu inhibieren, sollte näher untersucht werden.

Die folgenden Versuche wurden mit der NIH3T3-Zelllinie durchgeführt, die c-myc, c-Ha-ras und IRF-1-hER autoreguliert unter der Kontrolle des Tetrazyklin-abhängigen Promotors exprimieren (Kap. 2.2.2.1). Auf Grund der „Multi-step“-Theorie der Karzinogenese sind mehrere Mutationen in Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen für die Bildung von Tumoren nötig. Zellen, die durch zwei kooperativ wirkende Onkogene transformiert werden können, eignen sich daher am besten für ein *in vitro* Tumormodell.

Das Zellwachstum wurde mit Hilfe des „WST-Assays“ bestimmt. Dabei wird die Zellproliferation an Hand der metabolischen Aktivität der Zellen untersucht. Die Succinat-Tetrazolium-Reduktase, ein Enzym der Atmungskette in Mitochondrien, wandelt das Tetrazoliumsalz XTT in Formazan um. Die Spaltung von XTT führt zu einer Absorptionsänderung, die bei 420 nm bestimmt werden kann.

NIH3T3-Zellen, welche durch die Onkogene c-myc und c-Ha-ras und das IRF-1-hER Fusionsprotein bzw. nur das IRF-1-hER Fusionsprotein stabil exprimieren, wurden ausgesät und die Genexpression bzw. die Genaktivität induziert. Nach fünf Tagen Kultivierung wurde ein „WST-Assay“ durchgeführt. Die metabolische Aktivität von Zellen, die durch die Expression der Onkogene transformiert wurden, beträgt 95% gegenüber unbehandelten Kontrollzellen (NIH3T3, 100%). Transformierte Zellen weisen gegenüber nicht-transformierten Zellen eine erhöhte Proliferation auf, gleichzeitig erhöht sich aber auch der

Anteil sterbender Zellen. Durch die Einstellung eines Gleichgewichts zwischen erhöhter Proliferation und erhöhtem Zellsterben kann es zu einer etwas geringeren Proliferation im Vergleich zu den Kontrollzellen kommen. Die Aktivierung des IRF-1-hER-Fusionsproteins führt zu einer Proliferationsinhibition (60%). Bei gleichzeitiger Aktivierung der Onkogene c-myc und c-Ha-ras und des IRF-1-hER Fusionsproteins kommt es zu einer verstärkten Inhibition des Zellwachstums (40%). Die Ergebnisse zeigen, daß die Verringerung der metabolischen Aktivität durch IRF-1 in transformierten Zellen verstärkt ist. Dabei kann die Verringerung der metabolischen Aktivität verschiedene Ursachen haben wie eine Verringerung der Zellzahl oder eine Abnahme der Stoffwechselaktivität.

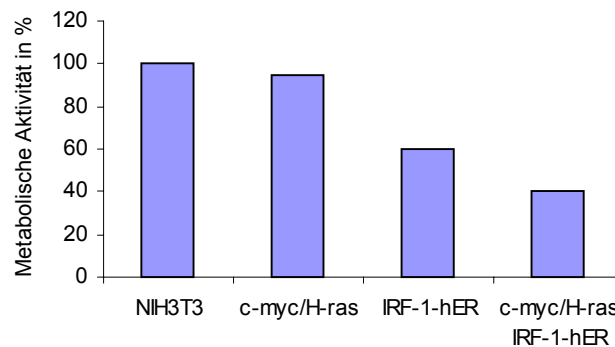


Abb. 2.7 Einfluß von IRF-1 auf die metabolische Aktivität transformierter Zellen

NIH3T3-Zellen, die stabil die Onkogene c-myc und c-Ha-ras, das IRF-1-hER Fusionsprotein oder c-myc, c-Ha-ras und IRF-1-hER unter der Kontrolle des autoregulierten tTA-Promotors exprimieren (Abb. 2.6), bzw. nicht transfigierte Ausgangszellen wurden ausgesät und die Geninduktion durch das Absetzen von Doxycyclin bzw. die Genaktivität durch Östradiol induziert. Nach 5 Tagen wurde die metabolische Aktivität der Zellen mit Hilfe eines WST-Assays bestimmt. Die metabolische Aktivität nicht exprimierender Zellen wurde gleich 100% gesetzt.

Zur Bestimmung der Anzahl lebenden Zellen diente die Zählung mit Trypanblau. Trypanblau dringt durch die beschädigte Zellwand in die toten Zellen ein. Tote blaue Zellen können lichtmikroskopisch von lebenden nicht-gefärbten Zellen unterschieden werden. 1×10^4 Zellen wurden ausgesät und die Genexpression bzw. die Genaktivität induziert. Nach fünf Tagen erfolgte die Quantifizierung der lebenden Zellen durch Trypanblaufärbung. Die Anzahl der lebenden IRF-1 exprimierenden Zellen ist gegenüber den nicht-IRF-1 exprimierenden Zellen und den Onkogen-exprimierenden Zellen reduziert (Abb. 2.8). Eine noch

stärkere Reduktion der Anzahl lebenden Zellen wurde nach Aktivierung von IRF-1 in transformierten Zellen nachgewiesen.

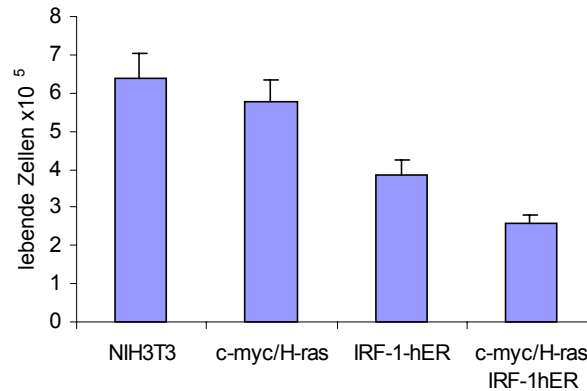


Abb. 2.8 Der Einfluß von IRF-1 auf die Anzahl lebender Zellen

1x 10⁴ NIH3T3-Zellen, die die Onkogene c-myc und c-Ha-ras, das IRF-1-hER Fusionsprotein oder c-myc, c-Ha-ras und IRF-1-hER unter der Kontrolle des autoregulierten tTA-Promotors stabil exprimieren, bzw. nicht transfizierte Ausgangszellen wurden ausgesät und die Geninduktion durch das Absetzen von Doxyzyklin bzw. die Genaktivität durch Östradiol induziert (s. Abb.2.7). Nach 5 Tagen Kultivierung wurde die Anzahl lebender Zellen mittels Trypanblau-Färbung bestimmt.

Die geringere metabolische Aktivität in nicht-transformierten IRF-1 exprimierenden Zellen korreliert mit der Verringerung der Anzahl lebender Zellen. In transformierten Zellen ist dieser Effekt der IRF-1-Expression verstärkt.

2.2.4 Simultane Aktivierung von IRF-1 und Onkogenen führt zum Zelltod

Die Expression von IRF-1 führt zu einer Verringerung der Zellzahl. Dieser Effekt wird in transformierten Zellen verstärkt (Abb. 2.8) und kann verschiedene Ursachen haben: 1) Verlangsamung des Zellwachstums; 2) Stop des Zellwachstums durch Auflaufen der Zellen in einer Zellzyklusphase; 3) Zelltod. Die Proliferationsinhibition in IRF-1 exprimierenden NIH3T3-Zellen erfolgt durch eine Verlangsamung des Zellzyklus und nicht durch einen Wachstumsstop oder durch Zelltod (S. Kirchhoff, persönliche Mitteilungen; Kirchhoff & Hauser, 1999). In der in diesem Kapitel beschriebenen Arbeit sollte untersucht werden, ob die verstärkte Inhibition der Proliferation durch IRF-1 in Zellen, die durch die Onkogene c-myc und c-Ha-ras transformiert wurden, durch das Sterben von Zellen verursacht wird.

Zwischen lebenden und toten Zellen kann mit Hilfe des DNA-Farbstoffs Propidiumiodid (PI) unterschieden werden. PI dringt durch die permeabilisierte Zellmembran toter Zellen in die Zellen ein und interkaliert in die DNA. Durch Anregung mit Fluoreszenz können lebende (ungefärbte) Zellen von toten (gefärbten) Zellen mit Hilfe des „Fluoreszenz Activated Cell Sortings“ (FACS) unterschieden werden. 5×10^3 Zellen wurden ausgesät und zu verschiedenen Zeitpunkten die Aktivität oder Expression des IRF-1-hER Fusionsproteins und der Onkogene induziert. Nach fünf Tagen wurden die Zellen geerntet, mit PI gefärbt und im FACS vermessen. NIH3T3-Zellen, die weder IRF-1 noch die Onkogene exprimieren, zeigen einen Anteil von 5-15% toter Zellen während der Kultivierung. In einer durch c-myc- und c-Ha-ras Expression transformierten Zellpopulation ist der Anteil toter Zellen wegen der schon beschriebenen erhöhten Zellsterberate etwas höher (10-20%). Eine Zellpopulation, in der die Zellen durch Östradiol aktiviertes IRF-1-hER Fusionsprotein exprimieren, nimmt der Anteil toter Zellen mit der Dauer der Induktion von 5 auf 30% zu. Zellen die gleichzeitig den Tumorsuppressor IRF-1 und die Onkogene c-myc und c-Ha-ras exprimieren zeigen den größten Anteil toter Zellen. Nach fünf Tagen Kultivierung steigt der Anteil toter Zellen auf 62%. Die Verringerung der Zellzahl bei der simultanen Expression von c-myc, c-Ha-ras und IRF-1 (Abb. 2.8) scheint eine Folge der erhöhten Zellsterberate zu sein.

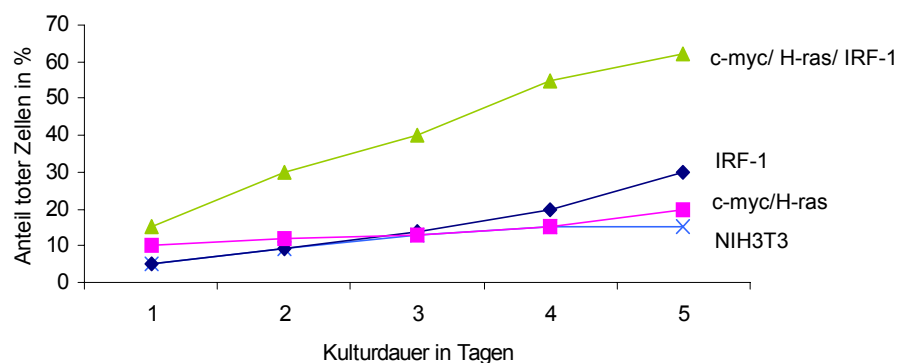


Abb. 2.9 Einfluß von IRF-1 auf die Lebensfähigkeit der Zellen

NIH3T3-Zellen, die die Onkogene c-myc und c-Ha-ras, das IRF-1-hER Fusionsprotein oder c-myc, c-Ha-ras und IRF-1-hER stabil autoreguliert unter der Kontrolle des tTA-Promotors exprimieren wurden ausgesät und die Geninduktion durch das Absetzen von Doxyzyklin bzw. die Genaktivität durch Östradiol induziert (s. Abb.2.7). Der Anteil lebender und toter Zellen wurde nach 5 Tagen Kultivierung durch PI-Färbung und anschließender FACS-Analyse bestimmt.

Beim Zelltod unterscheidet man zwei Arten: den programmierten (Apoptose) und den nicht-programmierten Zelltod (Nekrose). Apoptose ist ein aktiver Prozeß, bei dem die Aktivierung von spezifischen Zelltoten zur Eliminierung der Zellen führt. Dabei kommt es zu charakteristischen morphologischen und biochemischen Veränderungen wie „membrane blebbing“ und die Fragmentierung und Kondensierung von DNA. Im Gegensatz zur Nekrose, die mit der Schwellung der Zellen, Schädigung der Zellen und Entzündungsreaktionen durch den Austritt des Zellinhalts in die Umgebung einher geht, schrumpfen die Zellen bei der Apoptose, wobei die Zellorganellen nicht geschädigt werden und der Zellinhalt nicht in die Umgebung austritt.

Um zu untersuchen ob IRF-1 in der Lage ist, den Zelltod in transformierten Zellen zu induzieren, wurde ein Apoptose-Test durchgeführt. In frühen Apoptose-Stadien finden Veränderungen in der Zellmembran statt. Eine dieser Veränderungen der Plasmamembran ist die Translokation von Phosphatidylserin (PS) von der zytoplasmatischen Innenseite auf die Außenseite der Membran (Vermes et al., 1995). Annexin V bindet PS mit hoher Affinität, mit Fluorescein konjugiertes Annexin V (V) wird als Sonde für die PS-Exposition auf der Membranaußenseite apoptotischer Zellen eingesetzt (Fadok et al., 1992). Nekrotische Zellen binden durch den Verlust der Membran-Integrität ebenfalls Annexin. Durch die Verwendung von PI (P), das die permeabilisierte Membran nekrotischer Zellen passieren kann, können nekrotische (V^+/P^+) von frühen apoptotischen Zellen (V^+/P^-) unterschieden werden (Kroemer et al., 1995). Im weiteren Verlauf der Apoptose-Kaskade verlieren auch apoptotische Zellen die Membran-Integrität und können PI aufnehmen (P^+/V^+). Die Annexin-Färbung zeigt somit nur den momentanen Anteil der Zellen, die sich im frühen Apoptose-Stadium befinden. 1×10^4 Zellen wurden ausgesät und die Aktivität von IRF-1 bzw. die Expression der Onkogene induziert. Als Kontrolle dienten NIH3T3-Zellen, in denen Apoptose durch Hitzeschock induziert wurde. Nach dem Ernten wurden die Zellen mit Annexin V (V) und PI (P) gefärbt (Abb. 2.10). Unbehandelte Zellen zeigten einen Anteil von 1% an apoptotischen (V^+/P^-) und 13% an nekrotischen Zellen (V^+/P^+), während die Induktion von Apoptose durch Behandlung der Zellen mit Hitzeschock zu einem Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen auf 12% und der nekrotischen Zellen auf 27% führte. Zellen, in denen das Fusionsprotein IRF-1-hER aktiviert wurde, zeigten ähnlich wie durch c-myc und c-Ha-ras transformierte Zellen nur einen kleinen Anteil apoptotischer Zellen (1%, 2%). Im Ge-

gensatz dazu stieg der Anteil apoptotischer Zellen in IRF-1, c-myc und c-Ha-ras exprimierenden Zellen auf 9%. Die Ergebnisse zeigen, daß die Expression von IRF-1 oder den Onkogenen c-myc und c-Ha-ras nicht zu einer Induktion von Apoptose führt während nach Aktivierung von IRF-1 in transformierten Zellen, ein Teil der Zellen durch Apoptose stirbt.

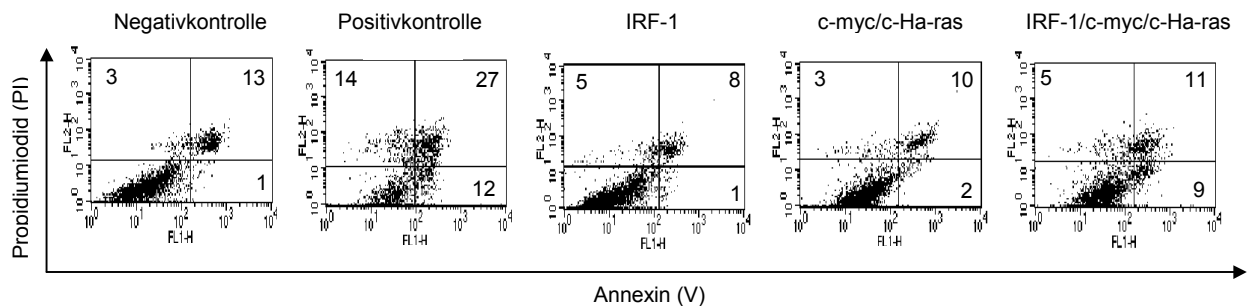


Abb. 2.10 IRF-1 induziert in transformierten Zellen Apoptose

NIH3T3-Zellen, die die Onkogene c-myc und c-Ha-ras, das IRF-1-hER Fusionsprotein oder c-myc, c-Ha-ras und IRF-1-hER stabil unter der Kontrolle des autoregulierten tTA-Promotors exprimieren wurden ausgesät und die Geninduktion durch das Absetzen von Doxzyklin bzw. die Genaktivität durch die Zugabe von Östradiol induziert. Nach 2 Tagen Kultivierung wurden die Zellen mit Annexin (V) und PI (P) gefärbt und im FACS analysiert. Die Zahlen geben den Anteil der Zellen in den entsprechenden Quadranten an.. Positivkontrolle: nicht transfizierte NIH3T3-Zellen, in denen Apoptose durch Hitzeschock induziert wurde; Negativkontrolle: nicht transfizierte NIH3T3-Zellen.

2.3 Entwicklung eines Maustumormodells zur Charakterisierung der IRF-1 Eigenschaften *in vivo*

Die tumorsuppressive Wirkung von IRF-1 *in vitro* wurde bereits in Abschnitt 2.2 beschrieben. IRF-1 vermittelt *in vitro* einen antiproliferativen Effekt in nicht-transformierten Zellen (Abb. 2.7; Kirchhoff et al., 1993) und u.a. durch die Induktion von Apoptose, einen tumorsuppressiven Effekt auf transformierte Zellen (Abb. 2.10; Kirchhoff & Hauser, 1999). Im nächsten Schritt sollten die *in vivo* Eigenschaften von IRF-1 näher untersucht werden. Ziel der in diesem Abschnitt beschriebenen Arbeit, ist die Etablierung eines Maus-Tumormodells zu Charakterisierung der IRF-1 Eigenschaften.

In dem Tumormodell sollen Mäuse auf ein externes Signal gewebespezifische Tumore bilden, auf die die Wirkung von IRF-1 zeitlich und quantitativ vorher bestimmbar untersucht werden kann. Wirkt IRF-1 als Tumorsuppressor, soll die Möglichkeit zum Vergleich der

tumorsuppressiven Wirkung von IRF-1 mit der Wirkung anderer Tumorsuppressoren, Medikamenten oder Tumorthapien auf die gleichen Tumore möglich sein.

2.3.1 Das Maustumormodell

Für das Tumormodell in Tieren sollte das in 2.2.1 beschriebene Modell auf transgene Mäuse übertragen werden. Die Verwendung des bidirektionalen Tetrazyklin-reprimierbaren Promotors in transgenen Tieren bietet dabei mehrere Vorteile. Durch die Regulierbarkeit der Genexpression mittels Tetrazyklin kann nicht nur der Zeitpunkt der Tumorinduktion bestimmt werden, es können außerdem toxische Effekte durch die Genexpression während der Embryonalentwicklung vermieden werden. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit der gewebespezifischen Expression. Durch das Einkreuzen von Mäusen, die den Transaktivator unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors exprimieren, kommt es nur in diesen Geweben zur Transgenexpression. Mittlerweile stehen mehrere Mäuse zur Verfügung in denen der Transaktivator gewebespezifisch exprimiert wird: Leber-spezifische Expression (Kistner et al., 1996), Herzmuskel-spezifische Expression (Passman & Fisher, 1994) und Bauchspeicheldrüsen-spezifische Expression (Efrat et al., 1994). Für das Maustumormodell wurde zunächst eine Leber-spezifische Expression des Transaktivators unter der Kontrolle des LAP-Promotors ausgewählt (Kistner et al., 1996), da die beiden Onkogene c-myc und c-Ha-ras mit humanen Lebertumoren assoziiert sind und eine Tumorentwicklung in transgenen Tieren gezeigt wurde (Sandgren et al., 1989).

Durch die Kombination von regulierter Genexpression durch den Tetrazyklin-reprimierbaren Promotor und regulierter Genaktivität durch Verwendung des Östradiol-abhängigen IRF-1-hER Fusionsproteins kann die Wirkung von IRF-1 zeitlich und quantitativ vorher bestimmbar auf die induzierten Tumore untersucht werden. Die Regulation von hER-Fusionsproteinen in transgenen Mäusen wurde bereits anhand anderer Proteine gezeigt (Evan et al., 1992).

Die Expression des Reportergens SEAP soll zum Nachweis der Transgenexpression genutzt werden. SEAP wird sekretiert und kann im Serum der Mäuse nachgewiesen werden (Baasner et al., 1996). Dies ermöglicht ein Verfolgen der Transgenexpression während der

Versuche am lebenden Tier. In Geweben kann die Transgenexpression abhängig von den verschiedenen Zelltypen unterschiedlich sein (Mosaikexpression). Um zu überprüfen ob die Tumorbildung mit der Transgenexpression korreliert ist es notwendig die Transgenexpression zu lokalisieren. Das Reportergen eGFP soll zur Lokalisierung der Transgenexpression genutzt werden.

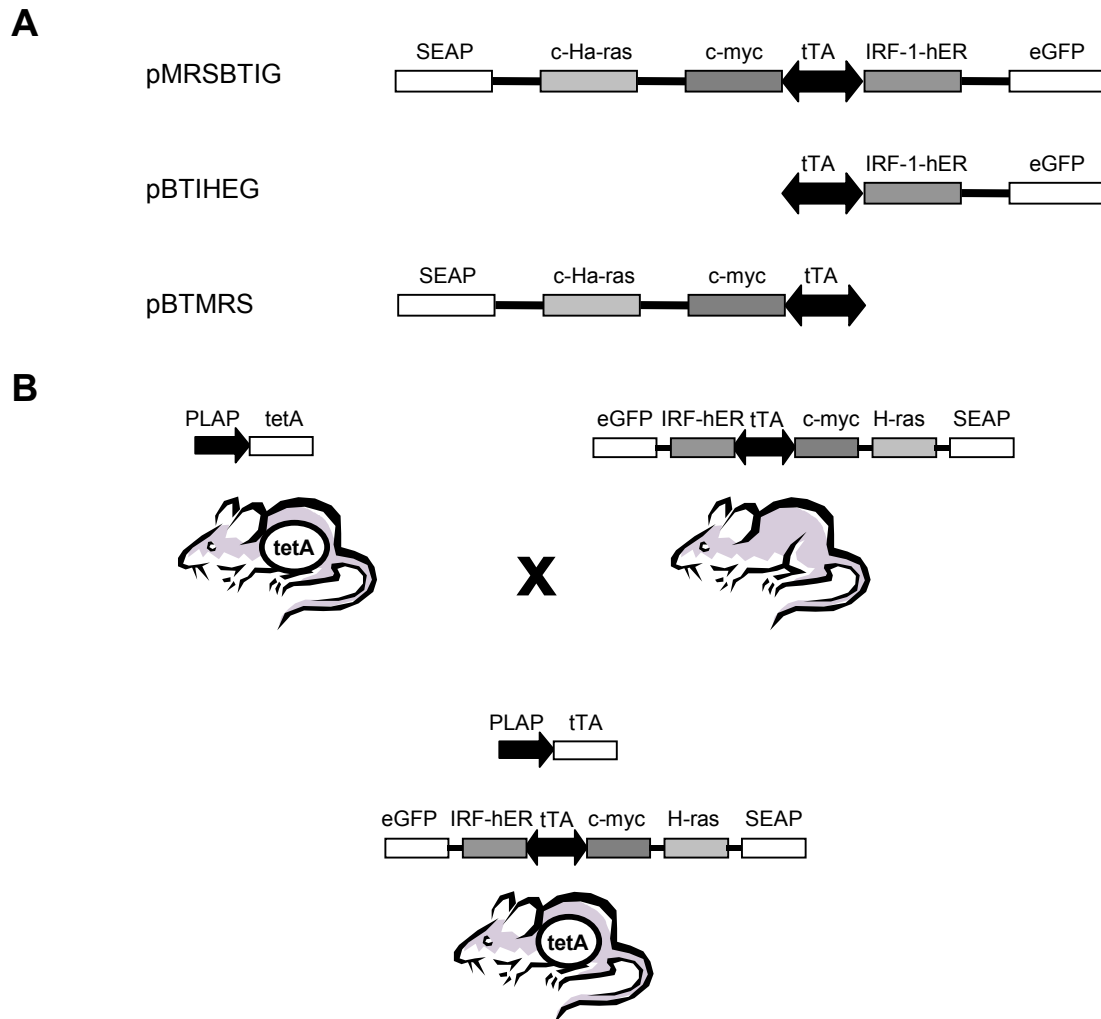


Abb. 2.11 Das Maustumormodell

A: Schematische Darstellung der Konstrukte, die zur Mikroinjektion verwendet wurden. Alle Gene werden mehrrestronisch unter der Kontrolle des bidirektionalen tTA-Promotors exprimiert. pMRSBTIG: Die Onkogene c-myc und c-Ha-ras und das Reportergen SEAP sind auch der linken Seite des Promotors eingezeichnet, das IRF-1-hER Fusionsprotein und das Reportergen eGFP auf der rechten Seite. pBTIHEG: IRF -1-hER und eGFP sind auf der rechten Seite des Promotors eingezeichnet. pBTMRS: Die Onkogene c-myc und c-Ha-ras und das Reportergen SEAP sind auf der linken Seite des Promotors eingezeichnet. B: Schematische Darstellung der Kreuzung zur Herstellung doppelt transgener Mäuse. Transgene Mäuse, die die Konstrukte pMRSBTIG, pBTIHEG oder pBTMRS ins Genom integriert haben werden mit transgenen Mäusen gekreuzt, die den Transaktivator unter der Kontrolle des leberspezifischen LAP-Promotors exprimieren. Doppelt transgene Mäuse exprimieren den Transaktivator in der Leber, der seinerseits die Expression des bidirektionalen tTA-Promotors aktiviert. PLAP: LAP-Promotor; schwarzer Balken: IRES-Element von Polio Virus

Für die Etablierung des Maustumormodells sollten aus den in Abb. 2.11 A dargestellten Konstrukten transgenen Mauslinien etabliert werden. In diesen Mäusen kommt es durch das Fehlen des Transaktivators nicht zur Transgenexpression. Durch Kreuzungen mit Mäusen, die den Transaktivator Leber-spezifisch exprimieren, soll die Transaktivierung des bidirektionalen tTA-Promotors in der Leber durch das Absetzen von Doxzyklin möglich sein.

Transgene Mäuse die das Konstrukt pMRSBTIG exprimieren sollen für die Evaluierung der IRF-1-Wirkung auf induzierte Leber-spezifische Tumore eingesetzt werden. Während transgene Mäuse, die das Konstrukt pBTIHEG exprimieren, zur Untersuchung der IRF-1-Wirkung auf normale Gewebe eingesetzt werden sollen. Mäuse, die das Konstrukt pBTMRS exprimieren, sollen zum einen zur Überprüfung der Tumorbildung genutzt werden, zum anderen zur Untersuchung der Wirkungen von etablierten Tumorthapeutika und Substanzen, die im HTS für IRF-1-Aktivatoren und –Induktoren identifiziert wurden. Durch die Untersuchungen an den gleichen Tumoren ist so ein Vergleich der IRF-1 Wirkung mit der Wirkung dieser Substanzen möglich.

2.3.2 Identifizierung der "Founder"

Die Herstellung transgener Tiere erfolgte in Prof. Bujards Labor (ZMBH, Heidelberg), durch Mikroinjektion der DNA-Konstrukte nach vorheriger Eliminierung des prokaryontischen Vektorrückgrades (Abb. 2.11 A) in die Vorkerne befruchteter Eizellen. Die Zygoten wurden in die Eileiter schein-schwangerer Mäuse transferiert. 74 (pBTIHEG), 54 (pBTMRS) und 67 (pMRSBTIG) lebende Nachkommen (Founder) wurden von jeweils sechs Empfänger-mäusen geboren. Durch Southernblot-Analysen wurde die Integration des Transgens in das Genom der Mäuse nachgewiesen (Abb. 2.12). Normalerweise kommt es in 10 bis 40% der mikroinjizierten Zygoten zu einer stabilen Integration des Transgens (Gordon et al., 1981). Der Anteil transgener Nachkommen liegt mit 47% für das pBTIHEG-Konstrukt, 40% für das pBTMRS-Konstrukt und 11,9% für das pMRSBTIG-Konstrukt im Rahmen der Erwartungen. Zwar liegt der Anteil transgener Nachkommen bei dem pMRSBTIG-Konstrukt mit 11,9% deutlich niedriger als bei den anderen Konstrukten, toxische Effekte durch Expression der Gene können allerdings ausgeschlossen werden, da

es wegen des Fehlens des Transaktivators nicht zu einer Transgenexpression kommen kann. Eine geringe Basalaktivität durch "side effects" kann aber nicht ausgeschlossen werden. Tabelle 2.1 faßt die Ergebnisse zusammen.

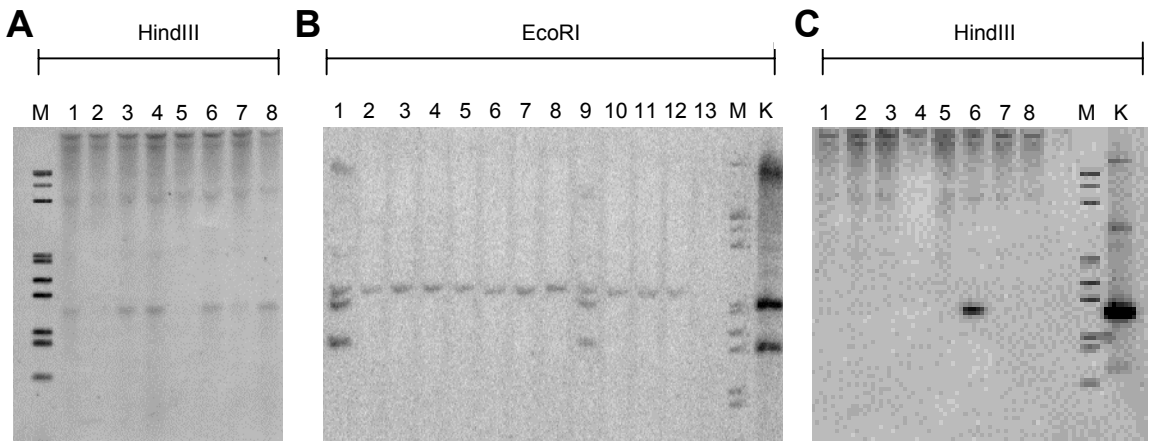


Abb. 2.12 Southern Blot-Analyse zur Identifizierung von transgenen Tieren.

Die genomische DNA aus der Schwanzspitze von Founder-Tieren wurden auf Integration des Transgens geprüft. Nach Restriktionsverdau der genomischen DNA mit HindIII bzw EcoRI wurden im Southern Blot die transgenen Mäuse identifiziert. A: Analyse einiger Founder der pBTIHEG-Mikroinjektion. Nach Hybridisierung mit einer IRF-1-Sonde zeigen die Spuren 1, 3, 4, 6, 7 und 8 das erwartete 1,2 kbp große Fragment. B: Analyse einiger Founder der pBTMRS-Mikroinjektion. Nach Hybridisierung mit einer IRES-Sonde zeigen die Spuren 1 und 9 die zwei erwarteten 2,0 und 1,3 kbp großen Fragmente. C: Analyse einiger Founder der pMRSBTIG-Mikroinjektion. Nach Hybridisierung mit einer IRF-1-Sonde zeigt die Spur 6 das erwartete 1,2 kbp große Fragment. M: λ -HindIII/EcoRI S³⁵ markiert; K: HMW-DNA aus NIH3T3-Zellen die mit pMRSBTIG transfiziert wurden.

		pBTIHEG	pBTMRS	pMRSBTIG
Empfängertiere	n	6	6	6
lebend geborene Jungtiere	n	74	54	67
durchschnittliche Wurfgröße	n	12,3	9	11,1
transgene Jungtiere	n	35	22	8
Anteil transgener Jungtiere	%	47	40	11,9

Tab. 2.1 Herstellung transgener Tiere

Bei 47% der 74 lebend geborenen Jungtiere der pBTIHEG Mikroinjektion, 40% der 54 lebend geborenen Jungtiere der pBTMRS Mikroinjektion und 11,9% der 67 lebend geborenen Jungtiere der pMRSBTIG Mikroinjektion konnte die Integration der Transgenen nachgewiesen werden. n: Anzahl.

2.3.3 Identifizierung doppelt transgener Tiere

Die Herstellung doppelt transgener Tiere erfolgte durch die Kreuzung der Foundertiere mit Mäusen, die den Transaktivator Leber-spezifisch exprimieren (Kistner et al., 1996). 44 Nachkommen wurden nach 8 Kreuzungen von pBTIHEG-Foundertieren mit tTA-Mäusen geboren. Bei 34% (15) Nachkommen konnte die Vererbung des Transaktivators und bei 29% (13) die Vererbung des Konstruktes nachgewiesen werden. Nur 9% (4) der Tiere waren transgen für tTA und pBTIHEG. Mit Foundertieren, die das Konstrukt pBTMRS integriert haben, wurde bisher nur eine Kreuzung durchgeführt. Die einzige bislang geborene Maus war weder für tTA noch für pBTMRS transgen. Von 32 Nachkommen der Kreuzungen von pMRSBTIG-Foundern und tTA-Mäusen wiesen 47% (15) den Transaktivator und 12,5% (5) das pMRSBTIG-Konstrukt auf. Doppelt Transgene Tiere konnten bei diesen Kreuzungen bisher nicht identifiziert werden.

Der Anteil transgener Nachkommen für den Transaktivator und die Konstrukte pBTIHEG bzw. pMRSBTIG liegt mit 34%, und 47% für tTA-tragende Nachkommen bzw. 29% und 12,5% für transgene Nachkommen mit den entsprechenden Konstrukten deutlich unter den erwarteten 50%. Noch gravierend niedriger ist der Anteil doppelt transgener Tiere mit 9% für pBTIHEG-Transgene und 0% für pMRSBTIG-Transgene (erwartet 25%).

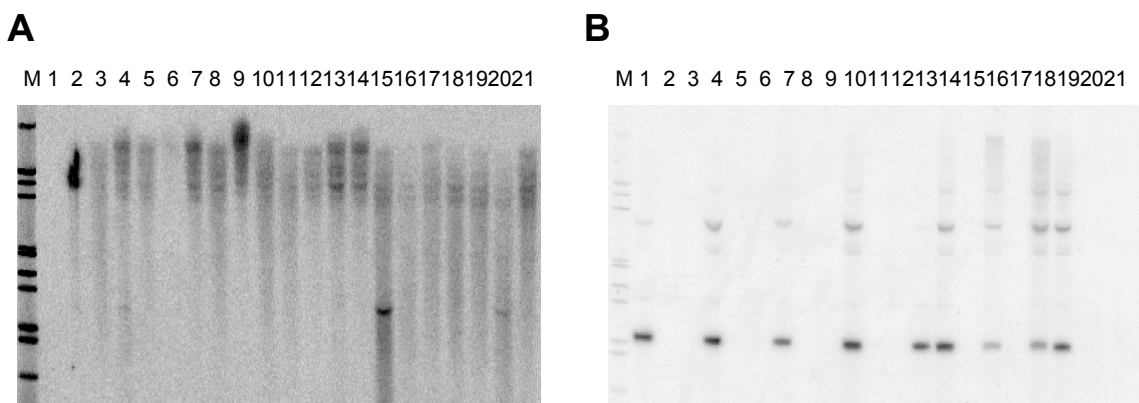


Abb. 2.13 Southern Blot-Analyse zur Identifizierung doppelt transgener Mäuse

Die genomische DNA aus der Schwanzspitze von Nachkommen aus einer Kreuzung von pBTIHEG-Foundertieren und PLAP-tTA-Tieren wurden auf Integration der Transgene überprüft. Nach Restriktionsverdau der genomischen DNA mit HindIII/XbaI wurde im Southern Blot die transgenen Mäuse identifiziert. A: Nach Hybridisierung mit einer IRF-1-Sonde zeigen die Spuren 4, 15 und 21 das erwartete 1,2 kbp große Fragment. B: Nach Hybridisierung mit einer tTA-Sonde zeigen die Spuren 1, 4, 7, 10, 13, 14, 16, 18 und 19 das erwartete 1,0 kbp große Fragment. Die DNA in Spur 4 weist beide Transgene auf. M: λ -HindIII/EcoRI S³⁵ markiert.

Ein negativer Effekt bei der alleinigen Weitergabe des Transaktivators konnte in der PLAP-tTA-Mauslinie bisher nicht beobachtet werden (H. Bujard, persönliche Mitteilung). Die geringe Anzahl Nachkommen muß demnach auf die Konstrukte, die für die Mikroinjektion verwendet wurden, oder auf die Kombination der Konstrukte mit dem Transaktivator in doppeltransgenen Tieren zurückgeführt werden. Vorstellbar wäre eine Erhöhung der Basalexpression durch die zusätzliche Expression des Transaktivators. In transgenen Tieren konnte so ein Effekt im Gegensatz zu permanenten Zelllinien nicht beobachtet werden (Kistner et al., 1996). Bisher publizierte Daten in transgenen Mäusen beziehen sich allerdings auf den einfachen, nicht auf den bidirektionalen tTA-Promotor. Daten über die Regulation des bidirektionalen tTA-Promotors in transgenen Mäusen stehen zur Zeit nicht zur Verfügung.

		pBTIHEG	pBTMRS	pMRSBTIG
Kreuzungen	n	8	1	5
lebend geborene Nachkommen	n	44	1	32
durchschnittliche Wurfgröße	n	5,5	1	6,4
tTA-transgener Nachkommen	n	15	0	15
Anteil tTA-transgener Nachkommen	%	34	0	47
Konstrukt transgene Nachkommen	n	13	0	5
Anteil Konstrukt-transgener Nachkommen	%	29	0	12,5
doppelt transgene Nachkommen	n	4	0	0
Anteil doppelt transgener Nachkommen	%	9	0	0

Tab. 2.3 Herstellung doppelt transgener Tiere

Kreuzungen mit pBTIHEG-, pBTMRS- und pMRSBTIG-Foundertieren und tTA-Mäusen ergab einen Anteil von 34% (pBTIHEG), 0% (pBTMRS) und 47% (pMRSBTIG) an tTA-transgenen Nachkommen, einen Anteil von 22% (pBTIHEG), 0% (pBTMRS) und 12,5% (pMRSBTIG) an Konstrukt-transgenen Mäusen und einen Anteil von 4,5% (pBTIHEG), 0% (pBTMRS) und 0% (pMRSBTIG) doppelt transgenen Mäusen.

Ein kritischer Faktor bei der Kreuzung könnte eine geringe Basalexpression des IRF-1-hER Fusionsproteins sein. Durch Erhöhung des Östrogenspiegels während der Schwangerschaft könnte es zu einer Aktivierung des Fusionsproteins kommen. Allerdings hätte diese wahrscheinlich auch schon die Etablierung der Foundertiere verhindert. Eine geringe Basalex-

pression der Onkogene sollte keinen Einfluß haben, da bereits Mäuse etabliert wurden, die c-myc und c-Ha-ras konstitutiv Leber-spezifisch exprimieren (Sandgren et al., 1989). Bei den Ergebnissen ist allerdings zu berücksichtigen, daß durch die geringe Anzahl der bisherigen Kreuzungen nur wage statistische Aussagen gemacht werden können. Weitere Kreuzungen konnten im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht durchgeführt werden, sind aber in Planung.

Um eventuelle toxische Effekte in doppelt transgenen Tieren auszuschließen werden zur Zeit homozygote Tiere der verschiedenen Linien hergestellt. Falls Nachkommen von Kreuzungen homozygoter Tiere überleben, ist ein toxischer Effekt ausgeschlossen.

2.4 Etablierung einer Screeningzelllinie für IRF-1 Induktoren und Aktivatoren

Für die Krebstherapie müssen neue Substanzen gefunden werden, die als Chemotherapeutika eingesetzt werden können. Dies ist notwendig, da bei der Behandlung mit den zur Verfügung stehenden Medikamenten zum Teil starke Nebenwirkungen auftreten und zur Zeit noch nicht alle Tumorerkrankungen behandelt werden können. Neue und interessante Substanzen können mit Hilfe von Screenings gefunden werden. In Screenings werden schon als Medikamente etablierte Substanzen auf ihre Funktion in verschiedenen Einsatzgebieten getestet. Zum anderen können in automatisierten Hochdurchsatz-Screenings (HTS) große Substanzbanken mit Hilfe von spezifischen Screeningsystemen auf eine bestimmte Funktion überprüft werden. HTSs ermöglichen so die Entdeckung neuer Leitstrukturen für die Medikamentenentwicklung. Die Etablierung des Screeningsystems für ein HTS ist besonders wichtig, um möglichst ausschließlich Substanzen zu finden, die die gesuchte Funktion erfüllen. Für die Entwicklung eines Screeningsystems müssen daher mögliche Angriffspunkte für Tumortheraeutika definiert und spezifische Testsysteme entwickelt werden. Ansatzpunkte für mögliche Tumortheraeutika sind molekulare Targets. Als molekulare Targets werden Gene definiert, die bei der gesuchten Funktion eine Schlüsselrolle spielen. Im Fall der Krebstherapie gelten Onkogene und Tumorsuppressorgene als molekulare Targets. Überexpression oder Deregulation von Onkogenen oder Funktionsverlust von Tumorsuppressorgen können zum Wachstumsvorteil der Zelle und schließlich zu Krebs führen. Durch die Entwicklung spezifischer Screeningsysteme sollen im HTS Substanzen gefunden

werden, die die normale Funktion der molekularen Targets wiederherstellen oder Zellen mit Defekten des molekularen Targets gezielt eliminieren.

Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, weist IRF-1 tumorsuppressive Eigenschaften auf. Eine länger anhaltende Expression oder Aktivität von IRF-1 führt in verschiedenen Zelllinien zur Proliferationsinhibition (Kirchhoff et al., 1993), in bestimmten Zelltypen zur Apoptose (Tamura et al., 1995). Auf Grund dieser Eigenschaften ist IRF-1 ein interessantes Target für die Tumorthherapie. Die Wirkung von IRF-1 könnte genutzt werden, um tumorgene Zellen zu eliminieren oder in ihrer Proliferation zu inhibieren. In allen somatischen Zellen und Zelllinien wird IRF-1 aber nur gering konstitutiv exprimiert und durch natürliche Aktivatoren transient induziert werden. Ziel war es, eine Screeningzelllinie für ein HTS zu etablieren, mit der man Substanzen finden kann, die die Regulation von IRF-1 so modulieren, daß es zu einer stärkeren Induktion oder zu einer länger anhaltenden Aktivität des endogenen IRF-1 kommt. Eine solche Induktion oder Aktivität kann durch IRF-1-Induktoren, -Aktivatoren sowie durch IRF-2-Inhibitoren hervorgerufen werden.

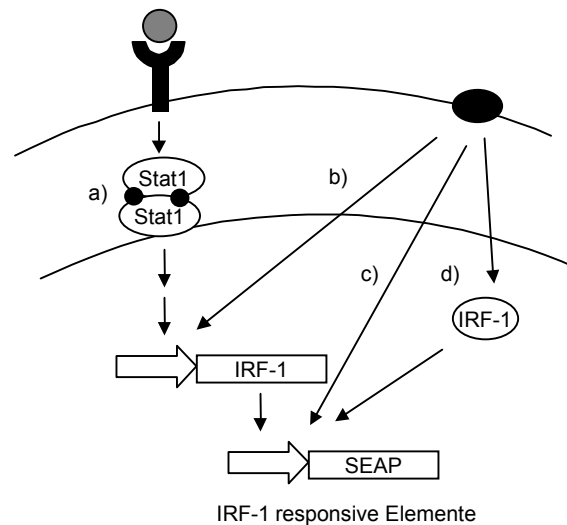


Abb. 2.14 Schematische Darstellung der Screeningstrategie

Die Wirkung von IRF-1 als Transaktivator wird als Meßparameter einer Screeningzelllinie eingesetzt. Neben Substanzen die a) über verschiedene Signaltransduktionswege oder b) durch direkte Bindung an den Promotor zu einer Transaktivierung von IRF-1 führen, können auch Substanzen identifiziert werden, die c) als IRF-1-Agonisten direkt an das Reportergen binden oder die d) die Transaktivierungsfähigkeit von latent in der Zelle vorliegenden IRF-1-Proteins modifizieren.

Bei der Etablierung eines Screeningsystems für IRF-1-Induktoren und -Aktivatoren muß ein geeigneter Meßparameter gefunden werden, mit dem alle Substanzen die einen spezifischen Einfluß auf IRF-1 haben, identifiziert werden können. IRF-1 wird durch verschiedene natürliche Induktoren wie Interferone, Zytokine oder Hormone sowie durch Virusinfektionen induziert. Die Induktionswege nutzen dabei intrazelluläre Signalmoleküle wie Stats, NFκB-Proteine und andere unbekannte Signalmoleküle. Ein Einfluß von Substanzen auf Rezeptoren und Signalmoleküle, die zu einer Induktion von IRF-1 führen, könnte durch die transkriptionelle Aktivität des IRF-1-Promotors charakterisiert werden. Da IRF-1 selbst ein transkriptioneller Aktivator ist und seine Wirkung über die Induktion von Targetgenen ausübt, schien es sinnvoll, die Wirkung von IRF-1 als Meßparameter zu nutzen. Neben den verschiedenen Induktionswegen über Rezeptor/Ligand-Bindung und Signaltransduktion, die zur Aktivierung von IRF-1 führen, können auch posttranslationale Modifikationen, die zu einer stärkeren transkriptionellen Aktivität von IRF-1 führen, Agonisten, die die gleichen Bindungsstellen wie IRF-1 binden und IRF-2 Inhibitoren, die das Bindungsverhältnis zwischen IRF-1 und IRF-2 zu Gunsten von IRF-1 verschieben, gefunden werden.

Im folgendem wird die Entwicklung eines Screeningsystems auf IRF-1-Induktoren und -Aktivatoren beschrieben.

2.4.1 Zelllinie

Für den Einsatz im HTS müssen Screeningzelllinien bestimmte Voraussetzungen erfüllen, die zum einen spezifisch für das jeweilige Screeningsystem sind und zum anderen allgemein für Zelllinien gelten, die im HTS eingesetzt werden sollen. Screeningzelllinien, die in einem HTS auf IRF-1-Induktoren und -Aktivatoren eingesetzt werden sollen, müssen folgende Voraussetzungen erfüllen : 1) Funktionalität der Signaltransduktionswege, die zur Induktion von IRF-1 führen; 2) Transaktivierung der IRF-1-Targetgene durch IRF-1; 3) starke Adhärenz. Im folgenden wird die Auswahl einer geeigneten Screeningzelllinie beschrieben.

Das Interferonsystem ist in der Evolution hoch konserviert. Bis auf wenige Ausnahmen sind die Gene zwischen Mensch und Maus austauschbar. Man kann deshalb annehmen, Daß als Zellsystem für ein HTS sowohl humane als auch murine Zelllinien in Frage kommen. Die verschiedenen Voraussetzungen für eine geeignete Screeningzelllinie wurden da-

her in der humanen 293-Fibroblasten-Zelllinie und den beiden murinen Fibroblasten-Zelllinien NIH3T3 und C243 getestet.

Funktionelle Signaltransduktionswege sind Voraussetzung für die Aktivierung von IRF-1 durch verschiedene Aktivatoren. Die Untersuchungen der Funktionalität verschiedener Signaltransduktionswege, die zur Induktion des IRF-1-Gens führen, wurde mit Hilfe eines Reporter-genkonstruktes durchgeführt, in dem der natürliche IRF-1-Promotor das Reporter-gen Luziferase reguliert. Eine Induktion des Reporter-genkonstrukts ist vergleichbar mit der Induktion des endogenen IRF-1-Gens, die Aktivität der Luziferase dient dabei als Maß der Transkription. Als natürliche Induktoren wurden IFN- β und IFN- γ verwendet. IFN- β aktiviert über Rezeptor/Ligand-Bindung Stat1 und Stat2, die nach Bildung eines Heterodimers in den Zellkern wandern, wo sie mit p48 den Transkriptionsaktivator-Komplex ISGF3 bilden und über Bindung an ISRE-Elemente den IRF-1 Promotor und andere ISGs aktivieren. IFN- γ ist der stärkste natürliche Aktivator von IRF-1 und wirkt ebenfalls über Rezeptor/Ligand-Bindung auf Stat-Moleküle. Im Gegensatz zu IFN- β aktiviert IFN- γ ausschließlich Stat1-Moleküle, die Homodimere bilden, in den Kern translozieren und durch Bindung an GAS-Sequenzen Promotoren transaktivieren.

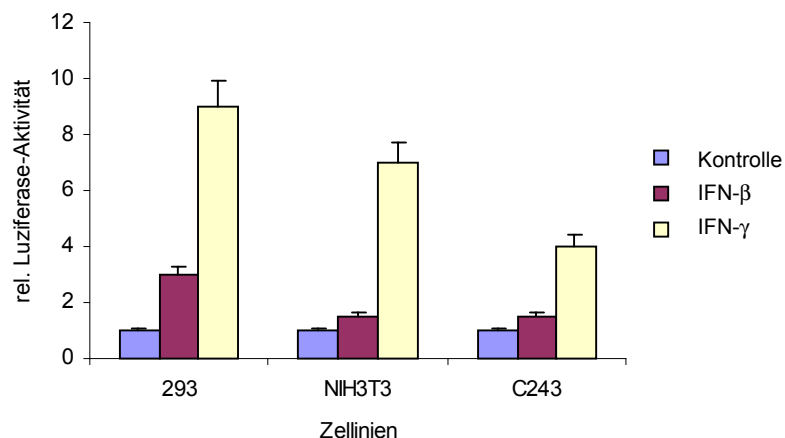


Abb. 2.15 Einfluß der Zelllinie auf die Induktion des IRF-1 Promotors

293-, NIH3T3- und C243-Zellen wurden transient mit einem Reporter-genkonstrukt transfiziert, in dem der IRF-1-Promotor das Luziferasegen reguliert. 40 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen 8 Stunden mit IFN- β oder mit IFN- γ stimuliert. Anschließend wurde die Luziferase-Aktivität in den Zellextrakten bestimmt. Die Luziferase-Aktivität der nicht induzierten Zellen wurde jeweils gleich 1 gesetzt.

293-, NIH3T3- und C243-Zellen wurden transient mit dem Reporter-genkonstrukt transfiziert und mit IFN- β und IFN- γ induziert (Abb. 2.15). In allen drei Zelllinien wird der IRF-1-

Promotor schwach durch IFN- β und stark durch IFN- γ induziert. Die Funktionalität der Signaltransduktionswege, die zur Induktion von IRF-1 führen, sind in allen drei Zelllinien gleichermaßen vorhanden.

Um die Funktionalität der Transaktivierung von IRF-1-Targetgenen durch IRF-1 in den verschiedenen Zelllinien zu untersuchen, wurde die Induktion eines natürlichen ISGs (ISG54) und eines artifiziellen Promotors mit ISRE Konsensus-Sequenzen (ISREII) untersucht. Beide Promotoren enthalten ISRE-Bindungsstellen, an die sowohl der ISGF3-Komplex als auch IRF-1 binden kann. Eine Transaktivierung durch IFN- β kann demnach direkt über die Bildung des ISGF3-Komplexes erfolgen oder indirekt über die Induktion von IRF-1, während eine Transaktivierung durch IFN- γ die Induktion von IRF-1 erfordert. Bei funktionellen Signaltransduktionswegen und funktioneller Transaktivierungsfähigkeit wird eine Aktivierung der Reportergenkonstrukte durch IFN- β , IFN- γ und IRF-1 erwartet, da alle drei Induktoren letztlich über die gleiche Konsensus-Sequenz wirken. 293-, NIH3T3- und C243-Zellen wurden transient mit den Reportergenkonstrukten transfiziert und mit IFN- β und IFN- γ induziert bzw. mit IRF-1 kotransfiziert.

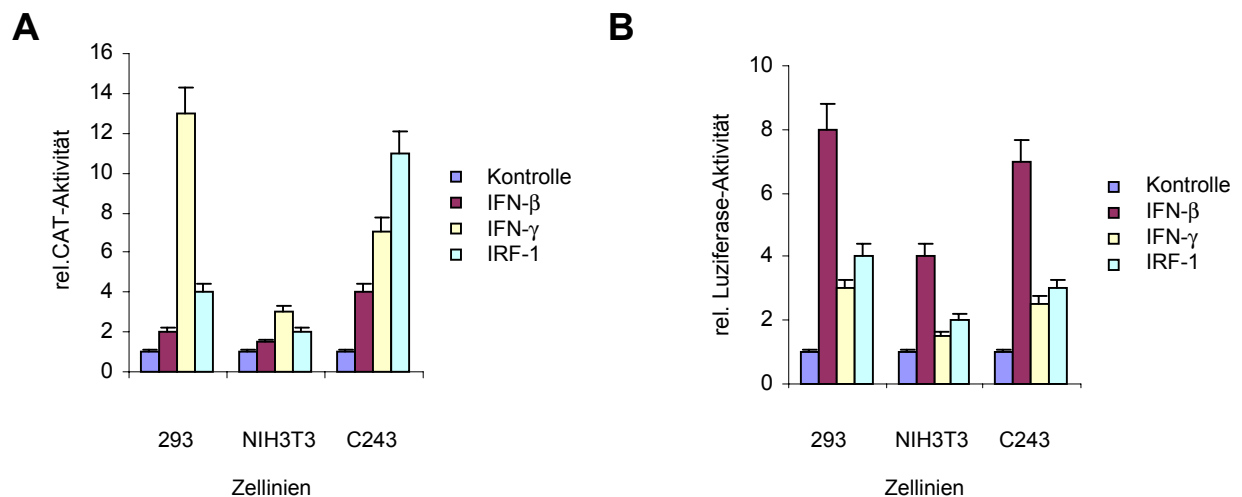


Abb. 2.16 Einfluß der Zelllinien auf die Induktion von ISGs

293-, NIH3T3- und C243-Zellen wurden transient mit verschiedenen Reportergenkonstrukten bzw. mit einem Expressionsplasmid für IRF-1 kotransfiziert. Die mit dem Reportergenkonstrukt allein transfizierten Zellen wurden 40 Stunden nach der Transfektion mit IFN- β oder IFN- γ stimuliert. Nach 8 Stunden wurde die Reportergenaktivität in den Zellextrakten bestimmt. Die Reportergenaktivität der nicht induzierten Zellen wurde gleich 1 gesetzt. A: Reportergenkonstrukt ISG54; B: Reportergenkonstrukt ISREII.

In Abb. 2.16 ist die relative Induktion der Reportergenkonstrukte dargestellt. In allen Zelllinien sind die notwendigen Signalmoleküle, die zur Induktion von ISGs führen, vorhanden. ISG54 läßt sich in 293- und C243-Zellen durch IFN- β , IFN- γ und IRF-1 induzieren. In NIH3T3-Zellen ist die Induktion aber signifikant geringer und erreicht maximal Faktor drei im Vergleich zur nicht induzierten Zelle. Das ISREII-Reportergenkonstrukt läßt sich dagegen in allen drei Zelllinien gut induzieren. Auf Grund der geringen Aktivierbarkeit des ISG54 eignen sich 293- und C243-Zellen besser als NIH3T3-Zellen für eine Screeningzelllinie zur Identifizierung von IRF-1-Induktoren und -Aktivatoren.

Zelllinien, die im HTS eingesetzt werden, werden durch das automatisierte Verfahren großen Belastungen ausgesetzt. Um eine Schädigung der Zellen beim automatischen Pipettieren zu vermeiden, sollten die Zellen eine starke Adhärenz aufweisen, robust und langlebig sein. Alle drei Zelllinien weisen diese Eigenschaften auf, allerdings zeigen NIH3T3- und C243-Zellen eine stärkere Adhärenz gegenüber 293-Zellen, die sich relativ leicht von der Kulturschale ablösen.

C243 Zellen eignen sich daher am besten als Screeningzelllinie, die im HTS eingesetzt werden soll. Neben den erforderlichen funktionellen Signaltransduktionswegen, die Transaktivierung von IRF-1 Targetgenen führen, sind sie robust, langlebig und weisen eine starke Adhärenz auf. Tabelle 2.1 faßt die Ergebnisse zusammen.

	293	NIH3T3	C243
IRF-1 Induktion	++	++	++
IRF-1 Wirkung	+	(+)	+
Antiproliferativer Effekt	n.d.	++	+
Adhärenz	(+)	+	+

Tab. 2.3 Eigenschaften von 293-, NIH3T3- und C243-Zellen

C243-Zellen eignen sich als Zelllinie für ein HTS auf IRF-1-Induktoren und -Aktivatoren am besten, da sie neben allen funktionellen Signaltransduktionswegen auch die nötige Adhärenz und Langlebigkeit aufweisen.

2.4.2 Reportergene

Für den Nachweis der Promotoraktivität muß ein Reportergen ausgewählt werden, das für ein HTS geeignet ist. Voraussetzungen die ein HTS-Reportergen aufweisen sollte, betreffen das Reportergen selbst und den Nachweis. Das Reportergen sollte eine relativ lange

Halbwertszeit besitzen. Kurze Halbwertszeiten von Protein und mRNA zeigen bei der Messung ein momentanes Bild der Transkription. Der Zeitpunkt der Messung ist dabei ein kritischer Faktor, da Substanzen mit unterschiedlichen Induktionsverläufen nicht in der selben Messung erfaßt werden können. Der Zeitpunkt der Messung bei Proteinen mit langer Halbwertszeit ist weitaus unkritischer. Eine Charakterisierung des Induktionsverlaufs ist zwar nicht möglich, da das Protein akkumuliert, die Induktion kann aber auch noch zu einem späteren Zeitpunkt gemessen werden.

Durch die hohe Automatisierung des HTS lassen sich komplizierte Pipettierschritte schlecht bewältigen. Das Nachweissystem des Reportergens sollte deshalb schnell und einfach durchführbar und automatisierbar sein. Um geringe Induktionen erkennen zu können, sollte der Test außerdem sensitiv sein und nicht störanfällig gegenüber den Testsubstanzen und den Lösungsmitteln, in denen sich die Testsubstanzen befinden. Ein großer linearer Meßbereich des Reportergens hat zwei Vorteile. Zum einen werden keine zusätzlichen Verdünnungsschritte benötigt, um im linearen Bereich zu messen, zum anderen können ohne größeren Aufwand Substanzen, die zu einer geringen Induktion führen von solchen, die zu einer hohen Induktion führen, unterschieden werden. Im Labor eingesetzte standardisierte Reportergene sind Luziferase, GFP und SEAP.

Die Luziferase weist eine geringe Halbwertszeit auf, so daß die Aktivität des Enzyms mit dem „steady-state“-Gehalt des Luziferase-Proteins und der mRNA korreliert (De Wet et al., 1987). Problematisch für den Einsatz im HTS ist der daraus resultierende kritische Zeitpunkt der Messung.

Die Fluoreszenz-Emission des Reportergens GFP erfordert keine exogenen Substrate oder Kofaktoren, GFP kann also ohne vorherige Behandlung in lebenden Zellen nachgewiesen werden (Chalfie et al., 1994). Das Hauptproblem bei der Verwendung von GFP als HTS-Reportergen ist die automatisierte Messung großer Probenmengen. Zwar ist es möglich, die GFP-Aktivität sehr sensitiv mittels FACS-Analyse zu bestimmen. Geeignete Fluoreszenzmessgeräte, mit ausreichender Sensitivität zur Messung der GFP-Fluoreszenz, für die Messung großer Probenmengen, sind jedoch nicht erhältlich.

SEAP ist eine membranständige alkalische Phosphatase, die von der Plazenta sekretiert wird. Die als Reportergen verwendete SEAP ist gentechnisch verändert und wird in den Kulturüberstand abgegeben (Berger et al., 1988), in dem sie direkt nachgewiesen werden

kann. Die SEAP-Aktivität kann zum einen schnell und einfach durch die Änderung der Absorption bei 402 nm in einem enzymatischen Assay nachgewiesen werden, die bei der Hydrolyse von gebundenem Phosphat des Substrats para-Nitrophenylphosphat auftritt, zum anderen sehr sensitiv durch die Messung der Lichtemission, die bei der Umsetzung von CSPD[®] frei wird.

Als geeignete HTS-Reportergene haben sich, durch ihre leichte und sensitive Nachweisbarkeit, Luziferase und SEAP herausgestellt. Anders als bei GFP stehen für diese Reporter etablierte, automatische und kostengünstige Assays zur Verfügung. Für eine Screeningzelllinie wurde SEAP als Reportergen gewählt, da diese eine lange Halbwertszeit aufweist und ohne weitere Behandlung der Zellen im Überstand nachweisbar ist.

2.4.3 Screeningzelllinie

Zum Nachweis der IRF-1-Wirkung, als Readout-Parameter einer Screeningzelllinie, muß ein geeignetes Reporterkonstrukt hergestellt werden. Das Reportergenkonstrukt sollte zum einen möglichst stark durch IRF-1 aktivierbar sein, zum anderen nur eine geringe Basalaktivität aufweisen. Durch einen möglichst großen Induktionsbereich lassen sich schon im ersten Screening schwach induzierende von stark induzierenden Substanzen unterscheiden. Eine weitere wichtige Eigenschaft ist die Spezifität der Reporter sollte möglichst ausschließlich durch IRF-1 oder IRF-1-Agonisten induzierbar sein.

Das IL-1 β konvertierende Enzym (ICE) und die induzierbare NO-Synthetase (iNOS) sind zwei der wenigen Gene, die in IRF-1^{-/-}-Mäusen nicht induziert werden (Kamijo et al., 1994). Die Induktion dieser Gene ist somit direkt abhängig von der Anwesenheit von IRF-1. Die IRF-1-Bindungsstellen aus den Promotoren dieser Gene wurden in einen Vektor integriert, so daß die IRF-1-Bindungsstellen 5' von einer PolyA-Sequenz und 3' von einem Minimalpromotor flankiert sind. Diese Anordnung gewährleistet eine möglichst geringe Basalaktivität (Abb. 2.17 A). Da unklar war, wie viele Bindungsstellen für eine optimale Induktion notwendig sind, wurden Bindungsstellen unterschiedlicher Anzahl verwendet. Durch randomisierte Multimerisierung und Integration der Bindungssequenzen entstanden Reporterkonstrukte mit unterschiedlicher Anzahl und Orientierung von IRF-1-Bindungsstellen (Abb. 2.17 A). Um zu testen, in wieweit die verschiedenen Reporterkonstrukte durch IRF-1 induzierbar sind, wurden C243-Zellen transient mit den Reportern und

IRF-1 kotransfiziert und die Reporterogenaktivität als Maß der Induktionsfähigkeit gemessen (Abb. 2.17 B). Die Reporterkonstrukte ICE1, ICE6 und ICE10 zeigten eine starke Stimulation durch IRF-1 (24-36 fach), während die restlichen Konstrukte nur eine geringere Induktion (3-7 fach) aufwiesen. Im allgemeinen ließen sich die Konstrukte mit IRF-1-Bindungsstellen aus dem ICE-Promotor besser induzieren als die Konstrukte mit IRF-1-Bindungsstellen aus dem iNOS-Promotor. Die ICE-Promotoren eignen sich deshalb besser als IRF-1-induzierbare Reportergenkonstrukte.

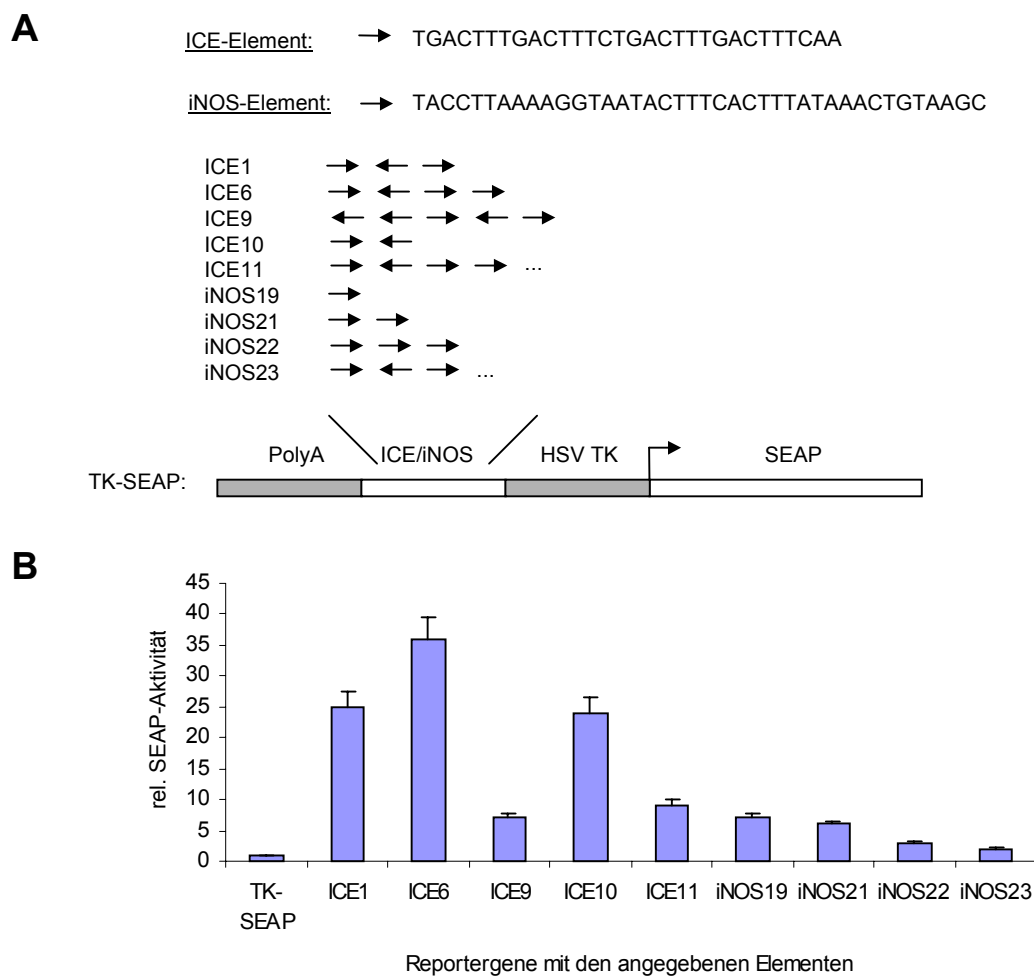


Abb. 2.17 IRF-1 induzierbare Reporterkonstrukte

A: Multimerisierte IRF-1 Bindungsstellen aus dem ICE- und dem iNOS-Promotor wurden pTK-SEAP 3' eines SV40 PolyA-Signals und 5' eines minimalen TK-Promotors inseriert. ICE: Interleukin-1 β -konvertierendes Enzym (Caspase 1); iNOS: induzierbare NO-Synthetase; HSV TK: minimaler TK-Promotor; PolyA: SV40 PolyA-Signal. B: Induzierbarkeit der verschiedenen Reportergenkonstrukte durch IRF-1. C243-Zellen wurden mit den in A abgebildeten Reporterkonstrukten und IRF-1 kotransfiziert. Die durch IRF-1 vermittelte Transaktivierung wurde nach 48 Stunden durch Messung der SEAP-Aktivität bestimmt. Die Reportergenaktivität des Ausgangsvektors (TK-SEAP) wurde gleich 1 gesetzt.

Die Induktionsfähigkeit der Reporterstrukture durch natürliche Aktivatoren von IRF-1 wurde durch Behandlung der Zellen mit Interferonen näher untersucht. Wie bereits beschrieben, transaktivieren IFN- β und IFN- γ IRF-1 über die Bildung von ISGF3 bzw. GAF und führen so zu einer indirekten Aktivierung der Reporterstrukturen. C243 Zellen wurden transient mit den Reporterstrukturen transfiziert und mit IFN- β und IFN- γ stimuliert bzw. mit IRF-1 kotransfiziert. Neben der schon oben beschriebenen Induktion durch IRF-1 lassen sich alle Konstrukte durch IFN- γ (3-10 fach) und schwach durch IFN- β (1-4 fach) induzieren.

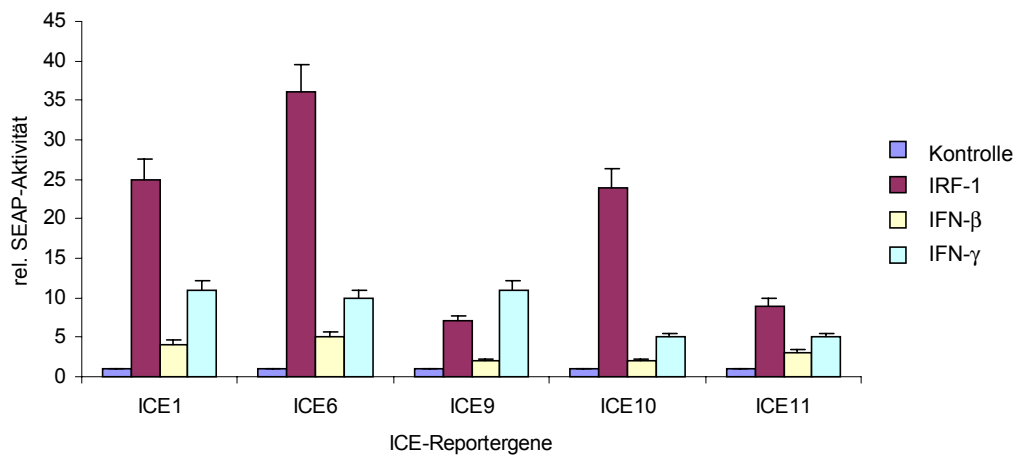


Abb. 2.18 Einfluß verschiedener Induktoren auf ICE-Reportergene

C243-Zellen wurden transient mit verschiedenen ICE-Reportergenen bzw. mit einem Expressionsplasmid für IRF-1 transfiziert. Die mit den Reportergenen allein transfizierten Zellen wurden 40 Stunden nach der Transfektion mit IFN- β oder IFN- γ stimuliert. Nach 8 Stunden wurde die Reporteraktivität im Überstand der Zellen bestimmt. Die Reporteraktivität nicht induzierten Zellen wurde gleich 1 gesetzt.

ICE10 besitzt im Vergleich zu ICE1 und ICE6 die wenigsten IRF-1-Bindungsstellen. Die geringen Unterschiede in der Induktionsfähigkeit zwischen den Konstrukten zeigt, daß ein kleiner Sequenzbereich für eine relativ starke Induktion ausreichend ist. Größere Sequenzbereiche, mit einer höheren Anzahl von IRF-1-Bindungsstellen, verstärken die Induktionsfähigkeit nur schwach, bieten aber mehr Möglichkeiten zur Bindung anderer Transkriptionsfaktoren und damit zur unspezifischen Aktivierung. Für die Etablierung der Screeningzelllinie wurde deshalb das Reportergenkonstrukt ICE10 ausgesucht. Stabile Zelllinien mit

dem ICE10-Reporterkonstrukt wurden etabliert. Ein Klon, der sich 40-50 fach durch IRF-1 und IFN- γ , aber nur schwach durch IFN- β induzieren läßt, wurde isoliert (Abb. 2.19).

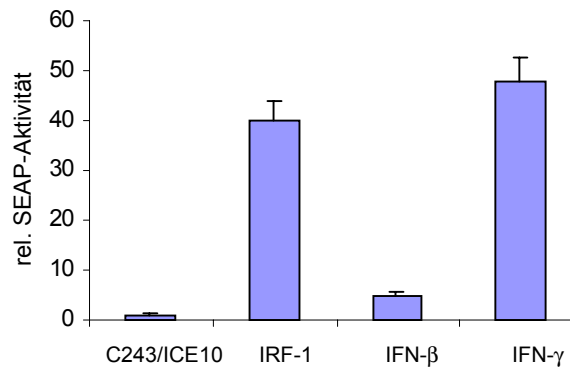


Abb. 2.19 Induzierbarkeit der Screeningzellinie

C243/ICE10-Zellen, die das Reporterkonstrukt ICE10 stabil integriert haben, wurde mit einem IRF-1 Expressionsplasmid transient transfiziert bzw. mit IFN- β oder IFN- γ stimuliert. 48 Stunden nach der Transfektion und 8 Stunden nach der Stimulation wurde die Transaktivierung des ICE10-Reportergens durch Messung der SEAP-Aktivität bestimmt. Die Reporteraktivität nicht behandelter Ausgangszellen wurde gleich 1 gesetzt.

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Etablierung einer Screeningzellinie ist die Übertragung der Ergebnisse von Laborstandard auf HTS-Standard. Im HTS werden Meßreihen im Mikrotitermaßstab durchgeführt. Um die etablierte Zelllinie unter HTS-Bedingungen zu testen, wurden Zellen auf Mikrotiterplatten ausgesät und mit Interferonen stimuliert bzw. mit IRF-1 kotransfiziert. Die Reporterogenaktivität wurde direkt in der Mikrotiterplatte bestimmt, ohne die Zellen von Überstand zu trennen. Die Induktionsfähigkeit unter HTS-Bedingungen lag um Faktor drei niedriger als unter Laborbedingungen (Daten nicht gezeigt), eine Anwendung der Zelllinie im HTS ist daher möglich.

Die isolierte Zelllinie mit dem Reportergenkonstrukt ICE 10 ist als Screeningzellinie für ein HTS auf IRF-1-Induktoren und –Aktivatoren geeignet, da sie neben einer hohen Induktionsfähigkeit durch IRF-1 und natürliche Induktoren auch im Mikrotitermaßstab einsetzbar ist.

2.4.4 Sekundärscreening

Bei der Durchführung eines HTS mit der unter 2.4.3 beschriebenen Zelllinie werden einige „Hits“ erwartet. Für den weiteren Einsatz ist es notwendig diese Substanzen näher zu cha-

arakterisieren. Ein wichtiger Schritt ist dabei die Definition der Wirkebene der Substanzen durch Sekundärscreeningsysteme (Abb. 2.20). Durch die Anwendung der entwickelten Sekundärscreeningsysteme werden drei Wirkebenen untersucht: 1) Wirkt eine Substanz spezifisch auf das IRF-1-responsive Element, oder kommt es zu einer unspezifischen Aktivierung? 2) Wirkt eine Substanz auf die Transkription von IRF-1? 3) Wirkt eine Substanz unabhängig von einer Induktion des IRF-1 Gens direkt auf das Reportergerkonstrukt?

Der wichtigste Punkt bei der Charakterisierung der Wirkebene einer Substanz ist die Untersuchung der Spezifität. Mit Hilfe von Reportergerkonstrukten deren Transaktivierung durch andere Transkriptionsfaktoren als IRF-1 erfolgt kann die Spezifität untersucht werden. Werden diese Reportergerkonstrukte durch Substanzen induziert, die auch das IRF-1-responsive Reportergerkonstrukt induziert haben, handelt es sich um unspezifisch wirkende Substanzen, die zu einer allgemeinen Transaktivierung führen.

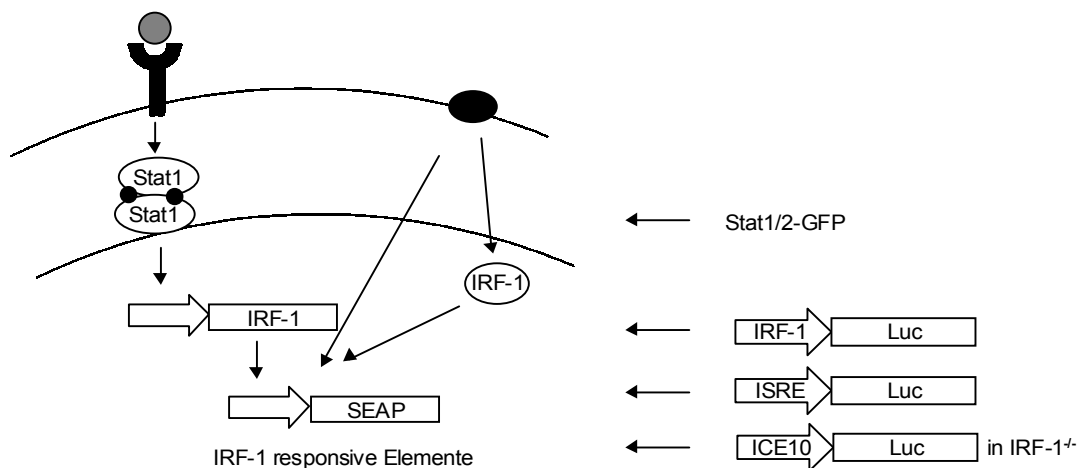


Abb. 2.20 Schematische Darstellung der Sekundärscreeningsysteme

Die Kerntranslokation der Stat-Proteine nach Aktivierung kann mit Hilfe von Stat-GFP-Fusionsproteinen visualisiert werden. Die Aktivierung von IRF-1 oder IRF-1 induzierbaren Genen kann mit Hilfe von Reporterkonstrukten überprüft werden, in denen der IRF-1 Promotor das Reportergergen Luziferase reguliert, oder ein Reportergerkonstrukt, das ISRE-Bindungsstellen enthält. Durch die Verwendung des ICE10 Reportergerkonstrukts in IRF-1^{-/-} Zellen kann eine Aktivierung unabhängig der IRF-1 Transaktivierung nachgewiesen werden.

Die spezifische Aktivierung des Reportergerkonstrukts kann über verschiedene Induktionswege erfolgen. So kann eine Induktion indirekt über die Transaktivierung des IRF-1-Gens führen oder direkt auf das Reportergerkonstrukt wirken. Eine Transaktivierung des

IRF-1-Gens kann mit Hilfe eines Reporter-genkonstruktes untersucht werden, in dem der natürliche IRF-1 Promotor das Luziferasegen reguliert. Kann nach Behandlung der Zellen Luziferase nachgewiesen werden, stimuliert die Testsubstanz die Transaktivierung von IRF-1. Eine nähere Charakterisierung der Signaltransduktionswege, die zur Transaktivierung von IRF-1 führen, kann mit Hilfe von Stat-GFP-Fusionsproteinen erfolgen. Sind Stat-Proteine bei der Signaltransduktion involviert, kommt es nach Aktivierung zu einer Kerntranslokation der Stat-Proteine. Diese kann mittels der Stat-GFP-Proteine am Mikroskop visualisiert werden (Köster & Hauser, 1999) (Abb. 2.21). Dabei kann durch Verwendung von Stat1-GFP- und Stat2-GFP-Fusionsproteinen zwischen einer Signaltransduktion, wie sie durch IFN- β und IFN- γ Stimulation induziert wird, unterschieden werden.

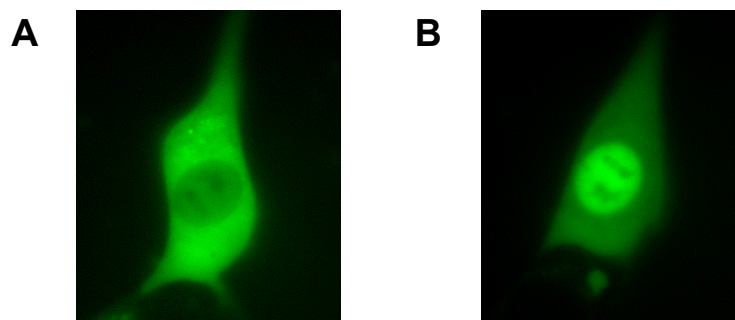


Abb. 2.21 Kerntranslokation von Stat1-GFP nach IFN- γ -Behandlung

C243-Zellen, die stabil Stat1-GFP exprimieren, wurden auf Lab Tek "Chamber Slides" ausgesät und mit IFN- γ behandelt. Vor und nach der Induktion wurde die Lokalisierung des Fusionsproteins in der gleichen Zelle am Fluoreszenz-Mikroskop bestimmt (630-fache Vergrößerung). A: vor IFN- γ -Behandlung; B: 2 Stunden nach IFN- γ -Behandlung.

Kommt es zur direkten Transaktivierung des Reporter-genkonstrukts, ohne vorherige Induktion des IRF-1 Gens durch die Substanz, können neben posttranslationalen Modifikationen des in geringen Mengen konstitutiv in der Zelle vorliegenden IRF-1s, IRF-2-Inhibitoren oder IRF-1-Agonisten verantwortlich sein. IRF-1 Agonisten, die an Stelle von IRF-1 an den Promotor des Reporter-genkonstrukts binden und zu einer Transaktivierung führen, können mit Hilfe von IRF-1 „knock out“-Zellen identifiziert werden. Modifikation oder Induktion von IRF-1 ist in diesen Zellen ausgeschlossen, eine Aktivierung des ICE10 Reporterkonstrukts kann nur durch die Wirkung der Substanz erfolgen.

Mit Hilfe der hier vorgestellten verschiedenen Sekundärscreeningsysteme ist es möglich, die Spezifität und die Wirkebene der Substanzen näher zu charakterisieren.

3 Diskussion

Krebs ist die zweithäufigste Todesursache in Industrieländern. Ein Hauptanliegen ist es deshalb neue Medikamente für die Tumorthapie zu entwickeln. IRF-1 ist ein transkriptioneller Aktivator, der tumorsuppressive Eigenschaften aufweist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Tumormodell etabliert, mit dem die tumorsuppressive Wirkung von IRF-1 als Target für eine Tumorthapie in permanenten Zelllinien und transgenen Tieren evaluiert wurde. Es basiert auf der konditionalen Transformation und der differentiellen Aktivierung des Tumorsuppressors und kann neben der Targetvalidierung auch zur Validierung von Substanzen eingesetzt werden. Im zweiten Teil der Arbeit wurden Reporterzelllinien entwickelt, die das Auffinden und Charakterisieren von Substanzen, die die Wirkung von IRF-1 modulieren, im HTS ermöglicht.

Im folgenden soll das Tumormodell, die Wirkung von IRF-1 auf transformierte Zellen und neue Strategien zur Medikamentenentwicklung diskutiert werden.

3.1 Tetrazyklin-regulierte Genexpression

Für die Charakterisierung tumorsuppressiver Eigenschaften von IRF-1, sollte ein Tumormodell entwickelt werden, das die konditionale Transformation von Zellen ermöglicht. Durch die Verwendung des trans-regulierten tTA-Systems (Gossen & Bujard, 1992), basierend auf der konstitutiven Expression des Transaktivators und der Expression des zu untersuchenden Gens unter der Kontrolle des Tetrazyklin-abhängigen Promotors, wurde versucht eine induzierbare Transformation zu erreichen. Die Ergebnisse zeigen, daß es auch im reprimierten Zustand des Promotors zu einer geringen Transformation (Ausbildung von Weichagarklonen) kommt (Abb. 2.5). Die Transformation der Zellen war auf die unvollständige Repression des Promotors zurückzuführen und konnte durch die Messung des Reportergens SEAP, das im letzten Cistron des Konstruktes lokalisiert ist, nachgewiesen werden. Eine konditionale Transformation der Zellen mit Hilfe des trans-regulierten Tetrazyklin-abhängigen Expressionssystems war nicht möglich.

Die Regulation des Tet-off-Systems ist von verschiedenen Parametern abhängig. So ist die Induktionshöhe von der Konzentration des Transaktivators abhängig (Shockett et al.,

1995). Eine hohe Dosis des Transaktivators ist auf Grund des VP16-Anteils zytotoxisch und führt zu einem "Squelching Effekt". Es hat sich aber gezeigt, daß auch der chromosomale Locus, in den das zu regulierende Gen integriert einen Einfluß auf die Expression haben kann (Wilson et al., 1990). Auf diese Weise kann die Integration in einen transkriptionell aktiven Locus eine vollständige Repression verhindern. Ein für die regulierte Expression optimaler genomischer Locus wird als „silent but activatable“ bezeichnet und zeigt in Anwesenheit von Tetrazyklin keine Expression, in Abwesenheit von Tetrazyklin eine hohe Expression (Gossen et al., 1995). Schließlich können sich multimerisierte DNA-Fragmente in einem genomischen Locus gegenseitig in ihrer Expression beeinflussen (Garrick et al., 1998), was sowohl zu einer unvollständigen Repression als auch zu einer Verringerung der Expression führen kann.

Von Shockett et al. (1995) wurde erstmals ein autoreguliertes System beschrieben, in dem die Transaktivatorexpression durch den Tetrazyklin-abhängigen Promotor reguliert wird. Neben einer Erhöhung der induzierten Aktivierung durch die kurzfristig hohe Expression des Transaktivators kam es zu einer Erniedrigung der Basalaktivität der Expression in Anwesenheit von Tetrazyklin. Dies ließ darauf schließen, daß eine niedrige Transaktivator-Konzentration den Basalspiegel des zu exprimierenden Gens erniedrigt. Ein Nachteil des von Gossen und Bujard (1992) entwickelten Systems ist die Notwendigkeit zum einen den Transaktivator und zum anderen das zu regulierende Gen zu transferieren. Durch die Verwendung von IRES-Elementen konnten beide Gene auf einem DNA-Fragment transferiert werden (Hoffman et al., 1996). Nachteile eines solchen Systems sind eine geringere Expression des 2. Cistrons und die Tatsache, daß die Cap-unabhängige Translation in verschiedenen Zelltypen zu unterschiedlichen Expressionshöhen führt (Borman et al., 1997). Durch die Verwendung des bidirektionalen Tetrazyklin-abhängigen Promotors (Baron et al., 1995) bei dem auf der einen Seite des Promotors der Transaktivator und auf der anderen Seite das Gen exprimiert wird, konnten diese Probleme gelöst werden (Mohammadi & Hawkins, 1998).

Das in dieser Arbeit verwendete autoregulierte System nutzt eine Kombination aus der multicistronischen Expression und Verwendung des bidirektionalen Tetrazyklin-abhängigen Promotors. Neben der autoregulierten Expression des Transaktivators ist so die Expression mehrere Gene unter der Kontrolle desselben Promotors und der Transfer meh-

rere Gene auf einem DNA-Fragment möglich. Die Anwendung dieses Systems verhinderte in Anwesenheit von Doxyzyklin die Expression der Onkogene während in Abwesenheit von Doxyzyklin diese durch die Bildung von Weichagarklonen gezeigt werden konnte (Abb. 2.6). Die strikt regulierte Expression des Reportergens SEAP bestätigt die Ergebnisse. Allerdings ist zu bedenken, daß die Regulation der Genexpression nur anhand der Ausbildung eines Phänotyps (Transformation) nachgewiesen wurde. Eine geringe Basalexpression der Onkogene, z.B. durch den Einfluß der chromosomalen Integrationsorte, die nicht zur Ausbildung des transformierten Phänotyps führen ist denkbar. Versuche, in denen eine einzige Kopie eines autoregulierbaren Genkonstrukts (durch retroviralen Gentransfer oder Elektroporation) in das Genom von Zellen integriert wurde, haben gezeigt, daß eine hohe Basalexpression u.a. durch den Einfluß der chromosomalen Umgebung, durch die Verwendung des hier beschriebenen autoregulierten Expressionssystems unterdrückt werden kann (J. Unsinger, persönliche Mitteilung). Eine Tetrazyklin-abhängige Regulation der Genexpression mit nur geringer Basalexpression kann mit diesem System unabhängig vom chromosomalen Integrationsort erreicht werden.

3.2 IRF-1 revertiert den Phänotyp transformierter Zellen

Die Überexpression von IRF-1 kann den transformierten Phänotyp von Zellen, die durch die Onkogene c-myc oder fosB transformiert wurden, revertieren (Tanaka et al., 1994). Onkogene werden in verschiedene Klassen eingeteilt: a) Wachstumsfaktoren und Rezeptor-Tyrosinkinasen, b) GTP-bindende und zytoplasmatische Proteine und c) nukleäre Proteine. Die verschiedenen Klassen bilden Komplementationsgruppen, d.h. Onkogene der verschiedenen Klassen können bei der Transformation kooperativ wirken. c-myc und fosB sind nukleäre Onkogene. Es sollte untersucht werden, ob IRF-1 die transformierten Phänotypen von Zellen unterdrücken kann, die durch die Expression von Onkogenen verschiedener Unterklassen hervorgerufen werden.

Durch HER2, c-Ha-ras oder c-myc transformierte Zellen zeigten nach Aktivierung von IRF-1 keine Bildung von Weichagarklonen (Abb. 2.5). IRF-1 ist also in der Lage den transformierten Phänotyp von Zellen durch Expression von Onkogenen unterschiedlicher Klassen zu revertieren.

Autokrine Signalwege die über Rezeptoren von bestimmten Wachstumsfaktoren wirken sind an der Progression von Tumoren beteiligt. Die Überexpression von HER2 (erbB2/185^{erbB2}) durch Genamplifikation ist mit humanen Adenomen assoziiert (Hynes, 1993). HER2 gehört zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen und weist eine hohe Homologie zur EGFR-Familie auf. Nach Rezeptor/Ligand-Bindung kommt es zur Aktivierung einer Reihe von Signaltransduktionswegen wie der ras/raf Signalkaskade (Ullrich & Schlessinger, 1992) die u.a. zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren c-jun und c-myc führen und einer Aktivierung von Stat-Proteinen (Park et al., 1996).

Ras-Proteine sind GTP-bindende Proteine die bei der Vermittlung mitogener Wachstumssignale eine Schlüsselrolle spielen. Mutationen die zu einem Verlust der Regulation der Proteine führen wurden in vielen humanen und murinen Tumoren nachgewiesen (Bos, 1989). Ras-Proteine aktivieren verschiedene Signaltransduktionskaskaden (Daum et al., 1994). Eine dieser Kaskaden ist die ras/raf/MEK/ERK-Kaskade. Einen Einfluß auf den Zellzyklus nimmt ras über die Stimulation der ZyklinD Expression die schließlich zu einer Phosphorylierung von Rb und somit zum Übergang der Zellen in die S-Phase führt.

Die Erhöhung der Expression des Proto-Onkogens c-myc, als Konsequenz genetischer Rearrangements ist mit vielen menschlichen und tierischen Tumoren assoziiert (Magrath, 1990; Adams & Cory, 1991). c-myc ist als Transkriptionsaktivator an der Regulation des Zellzyklus, der Differenzierung und des programmierten Zelltods (Apoptose) beteiligt (Henrikson & Lüscher, 1996). Die Aktivität hängt dabei von der Interaktion mit anderen Proteinen ab. Homodimerisierung (myc/myc) und Heterodimerisierung mit Max (myc/Max) führen zu transkriptionell aktiven Dimeren (Amati et al., 1992) während Max/Max Homodimere nicht als Transaktivator wirken (Kato et al., 1992). Die Überexpression von c-myc führt somit vorwiegend zur Bildung von myc/myc Homodimeren und Myc/Max Heterodimeren, die zur Aktivierung von direkt oder indirekt an der Regulation von Genen beteiligt sind, die den Zellzyklus oder die Proliferation wirken. So kommt es zu einer Aktivierung der c-myc-induzierbaren Gene Ornithin-Decarboxylase (ODC) (Wagner et al., 1993) und cdc25A (Galaktionov et al., 1996), sowie zu einer erhöhten Aktivität von cdk2, die wahrscheinlich auf die Inhibition des cdk2-Repressors p27 zurückzuführen ist (Vlach et al., 1996).

Die Ergebnisse der Weichagarklonierung zeigen, daß IRF-1 trotz der unterschiedlichen Signalwege, die die Onkogenen aktivieren, die Ausprägung des transformierten Phänotyps der Zellen verhindern kann. Kirchhoff & Hauser (1999) konnten zeigen, daß IRF-1 auch den tumorigenen Phänotyp von Zellen revertieren kann, die durch virale Onkogene transformiert wurden. Die Bildung von Weichagarklonen von E1a/b und MLV transformierten Zellen konnte verhindert werden.

Für die Entstehung von Tumoren sind mehrere Mutationen notwendig. Dabei wirken die Onkogenen kooperativ. Die Transformation durch zwei kooperativ wirkenden Onkogene führt zu einer verstärkten Onkogenität der Zellen. Es sollte daher untersucht werden, ob IRF-1 den transformierten Phänotyp von Zellen revertieren kann, die durch zwei kooperativ wirkende Onkogene transformiert wurden. Abb. 2.5 zeigt, daß die Bildung von Weichagarklonen in Zellen, die durch die Onkogene c-myc und c-Ha-ras transformiert wurden, durch die Aktivierung von IRF-1 verhindert werden kann.

Erste Hinweise auf die Kooperation zwischen den Onkogenen c-myc und c-Ha-ras während der Tumorigenese lieferte die Analyse humaner Tumore. Beide Gene wurden häufig in mutierter Form gefunden. Kooperative Effekte der Onkogene konnten mit Hilfe primärer Zelllinien gezeigt werden. Die alleinige Expression von c-myc und c-Ha-ras führt in primären Fibroblasten nicht zur Transformation, während die Expression beider Onkogene zur Ausbildung eines transformierten Phänotyps führt. Der Mechanismus des kooperativen Effekts zwischen dem Transkriptionsfaktor c-myc und dem GTP-bindenden Protein c-Ha-ras kann durch das indirekte Zusammenspiel der Onkogene während des Zellzyklus erklärt werden. Beide Onkogene sind an der Regulation des Übergangs der Zellen von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus erforderlich. Die Überexpression von c-myc führt zu einer Erniedrigung des Zyklin-abhängigen Inhibitors p27. Hieraus resultiert eine erhöhte Aktivität des ZyklinE/cdk2-Komplexes in Gegenwart von hypophosphoryliertem Rb. Auf der anderen Seite erhöht die Expression von c-Ha-ras die ZyklinD-Konzentration, was zu einer erhöhten Aktivität des ZyklinD/cdk4-Komplexes führt. Als Folge kommt es zur Auflösung des Rb/E2F-Komplexes durch Phosphorylierung von Rb. E2F stimuliert die Expression zahlreicher S-Phase Gene. Leone et al. (1997) konnte zeigen, daß für den kooperativen Effekt zwischen c-myc und c-Ha-ras eine erhöhte Akkumulation von ZyklinE und E2F verantwortlich ist.

Da IRF-1 den tumorigenen Phänotyp von Zellen revertieren kann, der durch die Expression von Onkogenen verschiedener Klassen hervorgerufen wird oder durch kooperativ wirkende Onkogene, scheint die Wirkung von IRF-1 unabhängig von Art und Stärke der Transformation zu sein. Ein spezifischer Mechanismus, der auf die Funktion der jeweiligen Onkogene gerichtet ist, ist durch die Aktivierung der unterschiedlichen Signaltransduktionswege unwahrscheinlich. Zwar wirken letztlich alle untersuchten Onkogene auf den Zellzyklus, tun dies aber über verschiedene regulatorische Faktoren wie Rb, ZyklinD/cdk4, E2F, Zyklin E/cdk2 u.a.. Tanaka et al. (1996) hat eine kooperative Induktion des cdk-Inhibitors p21^{WAF1} durch IRF-1 und p53 beschrieben. Die generelle Revertierung des transformierten Phänotyps kann durch die Wirkung des Zellzyklus-Inhibitors nicht erklärt werden, da auch durch E1a/b und durch c-myc/c-Ha-ras transformierte Zellen, deren Stimulation des Zellzyklus durch p21^{WAF1} nicht verhindert werden kann, revertiert werden können.

Vorstellbar wäre die Aktivierung von Genen, die durch IRF-1 induziert werden und die zu einer Proliferationsinhibition der transformierten Zellen oder direkt zur Verhinderung des transformierten Phänotyps führen. So ist in Glioblastoma-Zellen der Verlust der Tumorigenität durch Transfektion von IFN- α -Genen mit einer konstitutiv erhöhten Expression von PKR assoziiert (He et al., 1996). Die Expression des IRF-1-Targetgens Lysyl Oxidase (Tan et al., 1996) verhindert die Ausbildung des transformierten Phänotyps von c-Ha-ras transformierten Fibroblasten (Hajnal et al., 1993). Der genaue Mechanismus der IRF-1-Wirkung ist allerdings unklar.

3.3 IRF-1 induziert einen antiproliferativen Effekt

Die Überexpression von IRF-1 in NIH3T3-Zellen führt zur Proliferationsinhibition (ABB. 2.7; Kirchhoff et al., 1993). In transformierten Zellen ist die durch IRF-1 vermittelte Proliferationsinhibition verstärkt (Abb. 2.7). Durch Bestimmung des Anteils lebender Zellen mittels Trypanblau-Färbung konnte gezeigt werden, daß die Proliferationsinhibition mit einer Verringerung der Anzahl lebender Zellen korreliert (Abb. 2.8). Eine Verringerung der Zellzahl kann durch eine Beeinflussung des Zellzyklus durch das Auflaufen der Zellen in einer Zellzyklusphase, durch die Verlängerung der Zellzyklusphasen oder durch ein erhöhtes Zellsterben verursacht werden. In NIH3T3-Zellen, in denen IRF-1 überexprimiert wird, kommt es zu einer Verlängerung aller Zellzyklusphasen (S. Kirchhoff, persönliche

Mitteilung). Die Funktion von IRF-1 bei der Proliferationsinhibition ist unklar. In Hinblick auf die Transaktivierungsaktivität von IRF-1 scheint es wahrscheinlich, daß IRF-1 zur Aktivierung von Targetgenen führt, die eine Rolle in der Proliferationsinhibition spielen. Übereinstimmend mit dieser Vorstellung ist die Wirkung von IRF-1 von der DNA-Bindungsaktivität und der Transaktivierungsfähigkeit des Proteins abhängig (Kirchhoff et al., 1993). Tatsächlich ist die durch IRF-1 induzierbare PKR-Expression und -Aktivität in NIH3T3-Zellen essentiell für die antiproliferative Wirkung von IRF-1 (Kirchhoff et al., 1995). Koromilas et al. (1992) konnten zeigen, daß die Überexpression der PKR in NIH3T3-Zellen zur Proliferationsinhibition führt, während die Expression der dominant negativen Mutante PKR Δ 6 die PKR-Wirkung unterdrückt und zur Tumorbildung in Nacktmäusen führt. Im gleichen Kontext zeigt auch die durch IRF-1 induzierbare 2'-5'OASE antiproliferative Effekte. OASE synthetisiert 2'-5'-Oligoadenylate, die zu einer Aktivierung der latent in der Zelle vorliegenden RNaseL führen. Die Überexpression von RNaseL in NIH3T3-Zellen führt ebenfalls zu einer Proliferationsinhibition während die Expression einer dominant negativen Mutante zur Tumorbildung in Nacktmäusen führt (Hassel et al., 1993).

Sato et al. (1997) konnten einen Einfluß von IRF-1 bei der durch IFN- γ vermittelten Proliferationsinhibition in KG1 und primären hämatopoetischen Zellen zeigen. Im Gegensatz zu der Proliferations-inhibierenden Wirkung von IFN- γ auf diese Zellen, zeigten Zellen die zusätzlich Antisense IRF-1 exprimierten keine Proliferationsinhibition. Der stimulierende Effekt von IFN- γ war auf die Aktivierung von Stat1 und Stat3 zurückzuführen, was auf eine Inhibition der wachstumsstimulierenden Aktivität von Stat1 und Stat3 durch IRF-1 schließen läßt. Ein Einfluß von IRF-1 auf Proteine, die regulatorische Funktionen im Zellzyklus ausüben wurde von Tanaka et al. (1996) beschrieben. Embryonale Fibroblasten, in denen beide Allele von IRF-1 deletiert sind, zeigen keinen durch DNA-Schädigung induzierten Zellzyklusarrest. Die transkriptionelle Aktivierung des Zellzyklus-Inhibitors p21^{WAF1} durch Bestrahlung dieser Zellen ist von IRF-1 und p53 abhängig. Zusätzlich konnte eine IRF-1 abhängige Aktivierung von p21 in NIH3T3-Zellen gezeigt werden (Nguyen & Hiscott, 1997).

Wie es zu einer verstärkten Proliferationsinhibition durch IRF-1 in transformierten Zellen kommt, ist unklar. Ein Einfluß von IRF-1 auf den Zellzyklus wurde im Rahmen dieser Ar-

beit nicht untersucht. Vorstellbar wäre außerdem eine erhöhte Zellsterberate, die zu einer Verringerung der Anzahl lebender Zellen führen würde und somit für die verstärkte Proliferationsinhibition verantwortlich sein könnte. Durch Streß verursachte Apoptose konnte in PKR^{-/-}-Zellen verhindert werden, während durch PKR-Expression in der Proliferation gehemmte Zellen durch TNF α Behandlung starben (Der et al., 1997). Transformation könnte für die Zellen eine Art von Streß sein die in Kombination mit einer IRF-1 induzierten PKR-Expression zum Zelltod führt.

3.4 IRF-1 führt in transformierten Zellen zur Apoptose

Die verstärkte Proliferationsinhibition, die IRF-1 auf transformierte Zellen ausübt, ist das Resultat einer erhöhten Zellsterberate (Abb. 2.9). Durch Annexin-Färbung konnte gezeigt werden, daß ein Teil der transformierten Zellen, in denen IRF-1 aktiviert wurde, durch Induktion von Apoptose stirbt (Abb. 2.10). Im Gegensatz dazu führt die Expression von IRF-1 in normalen Fibroblasten zur Proliferationsinhibition und nicht zur Apoptose (Abb. 2.10; Kirchhoff & Hauser, 1999).

Eine Funktion von IRF-1 bei der Apoptose wurde bereits beschrieben. So ist IRF-1 an der durch IFN- γ induzierten Apoptose in humanen Darmkarzinomzellen beteiligt (Ossina et al., 1997) sowie an der Apoptose von R3T3-Zellen nach Angiotensin II-Behandlung (Horiuchi et al., 1997). Daß IRF-1 für die Induktion von Apoptose in transformierten Zellen essentiell ist, konnte Tanaka et al. (1994) zeigen. In embryonalen Fibroblasten aus IRF-1^{-/-}-Mäusen, die durch die Expression von c-Ha-ras transformiert wurden, führt durch γ -Strahlung verursachte DNA-Schädigung erst nach Komplementierung mit IRF-1 zum Zelltod durch Apoptose. In HER1 transformierten Zellen führt die Aktivierung des IRF-1-hER Fusionsproteins durch Östradiol zur Induktion von Apoptose (Kirchhoff & Hauser, 1999). Eine ähnliche Wirkung konnte auch für den Tumorsuppressor p53 gezeigt werden. In p53^{-/-} EFs wird die durch γ -Strahlung induzierte Apoptose verhindert (Lowe et al., 1993). Der Mechanismus der Tumorsuppressor-vermittelten Induktion von Apoptose ist unklar. Vorstellbar ist eine Aktivierung von Tumorsuppressor-Targetgenen, die kooperativ mit Genen, die durch die Onkogensignaltransduktion aktiviert werden, zur Induktion von Apoptose führen. In c-myb-transformierten Zellen wurde die Aktivierung von BAX, einem proapoptotischen

Gen, durch p53 nachgewiesen Sala et al., 1996). Die Expression von IRF-1 führt nicht zur transkriptionellen Aktivierung von BAX (Tamura et al., 1995). Allerdings konnte bei der durch DNA-Schädigung hervorgerufenen Apoptose in mitogen aktivierten reifen T-Lymphozyten eine IRF-1 abhängige Aktivierung von ICE (Kaspase 1) nachgewiesen werden. ICE ist das Säuger-Homolog des Zelltodgens *ced-3* aus *C.elegans*, dessen Überexpression Apoptose induzieren kann (Miura et al., 1993). Die Aktivierung ICE durch IRF-1 ist aber für die Induktion von Apoptose nicht ausreichend (Tamura et al., 1995). Neben ICE kommt es aber durch Interaktion mit Stat-Proteinen zur transkriptionellen Aktivierung von weiteren Kaspasegenen (Kumar et al., 1997).

Eine weitere Möglichkeit wie IRF-1 die Induktion von Apoptose in transformierten Zellen vermittelt, ist die synergistische Aktivierung von proapoptotischen IRF-1-Targetgenen. Kirchhoff & Hauser (1999) konnten zeigen, daß sie simultane Aktivierung von IRF-1 und des EGFR zu einer synergistischen Aktivierung von IRF-1 abhängigen Promotoren führt. Es wurde spekuliert, daß die Induktion der Apoptose durch IRF-1 in diesen Zellen durch die synergistische Aktivierung von IRF-1 Targetgenen hervorgerufen wird. Eine synergistische Aktivierung der Reporterkonstrukte in c-myc und c-Ha-ras transformierten Zellen konnte nach IRF-1 Aktivierung nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Allerdings ist der Anteil apoptotischer Zellen in IRF-1 und HER1 exprimierenden Zellen deutlich höher als in Zellpopulationen die durch die Onkogene c-myc und c-Ha-ras transformiert wurden.

Für einige Onkogene wie c-myc und E1A ist beschrieben, daß die Expression in Zellen abhängig von den Wachstumsbedingungen zur Proliferationsstimulation oder zur Apoptose führen kann (Evan et al., 1992). Die Expression von IRF-1 in diesen Zellen könnte die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Proliferation und Apoptose zu Gunsten der Apoptose bewirken. Der Tumorsuppressor p53 ist an der Induktion der Apoptose von c-myc-transformierten Zellen beteiligt (Harrington et al., 1994). Tanaka et al. (1996) konnten zeigen, daß die kooperative Bindung von IRF-1 und p53 für die Induktion des Zellzyklus-Inhibitors p21^{WAF1} verantwortlich ist. Ein Konflikt der Zellen zwischen Zellzyklusblock und Proliferation könnte somit zur Induktion von Apoptose führen.

3.5 Maustumormodelle zur Charakterisierung der IRF-1 Aktivität *in vivo*

Auf Grund der Wirkung von IRF-1 in transformierten Zellen Apoptose zu induzieren, während nicht transformierte Zellen lediglich in ihrer Proliferation inhibiert sind, ist IRF-1 ein interessantes Target für die Tumorthherapie. Für die weitere Evaluierung von IRF-1 als Target für die Tumorthherapie ist die Charakterisierung der IRF-1 Wirkung *in vivo* erforderlich. Es wurde daher ein Maustumormodell entwickelt, in dem Mäuse auf ein externes Signal gewebespezifische Tumore entwickeln, auf die die Wirkung von IRF-1 zeitlich und quantitativ vorher bestimmbar untersucht werden kann. Das Modell sollte zusätzlich die Möglichkeit bieten, die Wirkung von potentiellen und etablierten Tumortherapeutika auf dieselben Tumore zu untersuchen, um die Wirkung von IRF-1 mit der Wirkung der Substanzen vergleichen zu können. Für die Etablierung des Maustumormodells, sollte das in permanenten Zellen eingesetzte Tumormodell (2.2) auf Mäuse übertragen werden.

Der Vergleich der tumorsuppressiven Wirkung verschiedener Substanzen oder Proteine auf Tumore ist nur bei genetisch definierten Tumoren sinnvoll. Im Gegensatz zu Nacktmausmodellen und transgenen Tiermodellen ist die Induktion genetisch definierter Tumore in Inzuchtstämmen und Tiermodellen, in denen Tumore durch genetische Disposition, Strahlung oder Karzinogene erzeugt werden, nicht möglich. In Nacktmausmodellen und transgenen Tiermodellen kann eine konditionale Onkogenese eingesetzt werden. Die konditionale Onkogenese bietet neben der Möglichkeit den Zeitpunkt der Onkogenese zu bestimmen die Möglichkeit, die Abhängigkeit des Tumorwachstums von der Onkogenexpression zu bestimmen. Durch eine erhöhte Proliferation während der Tumorentwicklung kommt es zu einer Akkumulation weiterer wachstumslimitierender Mutationen. Kann nach Repression der Onkogenexpression der Tumor wieder zurückgebildet werden, ist das Tumorstadium von der Onkogenexpression abhängig. Kommt es dagegen zu einer weiteren Tumorentwicklung, sind andere Mutationen wachstumslimitierend und der Tumor ist nicht mehr genetisch definiert (Ewald et al., 1996).

Ein Nacktmausmodell zum Testen von therapeutisch wirksamen Substanzen gegen humane Adenome wurde beschrieben. Nacktmäusen wurden NIH3T3-Zellen implantiert, die das HER2-Onkogen unter der Kontrolle des tTA-Promotors exprimieren. Die Mäuse zeigen in Abhängigkeit von Tetrazyklin eine Tumorbildung (Baasner et al., 1996). Versuche zur

Übertragung des in dieser Arbeit beschriebenen Systems auf Nacktmäuse sind geplant. Nacktmausexperimente sind aber nur bedingt aussagekräftig, da es sich wegen des Einsatzes von permanenten Zelllinien um ein artifizielles System handelt. Zwar kann der Einfluß von Substanzen und Tumorsuppressorproteinen auf die Tumorentwicklung untersucht werden, eine Aussage über die Wirkung auf Gewebe-Tumore kann nicht gemacht werden. Transgene Tiere eignen sich daher für die Untersuchung der IRF-1 Wirkung auf Tumore besser.

Durch exogene Signale induzierte Tumorbildung in transgenen Tieren wurde bereits beschrieben. Die Expression des SV40 TAg unter der Kontrolle des Tetrazyklin-reprimierbaren tTA-Promotors in Mäusen, die den Transaktivator unter der Kontrolle des MMTV-LTR exprimieren, führt nach Absetzen von Tetrazyklin bei der Geburt nach 4 Monaten zur Tumorentwicklung im Brustdrüsengewebe (Ewald et al., 1996). Bis zu einem Alter von 7 Monaten konnte die Tumore durch die Repression der Genexpression zurückgebildet werden, was dafür spricht, daß es im Laufe der Tumorentwicklung zu einer Akkumulation von anderen Proliferations-limitierenden Mutationen kommt, so daß die Transgenexpression für die Tumorentwicklung nicht mehr essentiell ist (Ewald et al., 1996). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in transgenen Mäusen gezeigt die SV40 TAg Tetrazyklin-reguliert in der Bauchspeicheldrüse exprimieren (Efrat et al., 1995). Die Expression von SV40 TAg in humanen Tumoren konnte bisher nicht festgestellt werden. Zum Testen von Tumorthapeutika sind solche Tumormodelle zu bevorzugen, deren Tumorentwicklung durch Onkogene verursacht werden, die mit humanen Tumoren assoziiert sind. Ein Maustumormodell in dem für humane Tumore relevante Onkogene exprimiert werden, wurde von Sandgren et al. (1989) beschrieben. Transgene Mäuse die das Onkogen c-myc unter der Kontrolle des Albumin-Promotors exprimieren entwickeln innerhalb von 15-18 Monaten hepatozelluläre Karzinome (HCC). Die lange Latenzperiode bis zur Tumorentwicklung läßt auf die Akkumulation weiterer Mutationen, die für die HCC-Bildung notwendig sind, schließen. Gegenüber der c-myc-Expression entwickeln transgene Mäuse die im gleichen Kontext das c-Ha-ras-Onkogen exprimieren schon während der Entwicklung hyperplastische Veränderungen der Leber und sterben 4 Tage nach der Geburt. Tiere die eine geringere Transgenexpression aufweisen entwickeln demgegenüber nach 5 Monaten HCCs (Sandgren et al., 1989). Kooperative Effekte von c-myc und c-Ha-ras konnten durch

Kreuzung der beiden Transgenlinien gezeigt werden. Die HCC-Entwicklung wurde in diesen Mäusen nach 4 Monaten beobachtet.

In dem in dieser Arbeit entwickelten System soll es durch die Verwendung der kooperativ wirkenden Onkogene c-myc und c-Ha-ras nach Induktion der Expression zu einer schnellen Tumorentwicklung kommen. Sandren et al. (1989) zeigten in c-myc und c-Ha-ras exprimierenden Tieren eine Tumorentwicklung in der Leber innerhalb von 4 Monaten. Allerdings muß bedacht werden, daß eine c-Ha-ras transgene Linie mit geringerer Expression eingekreuzt wurde, da hoch exprimierende Tiere direkt nach der Geburt sterben. Durch die Verwendung des regulierbaren Promotors kann eine Schädigung der Tiere während der Entwicklung verhindert werden und eventuell eine höhere Transgenexpression und schnellere Tumorentwicklung erreicht werden. Zusätzlich bietet der tTA-Promotor die Möglichkeit, das etablierte Tumormodell auf andere Organe zu übertragen. Durch das Einkreuzen von Mäusen, die den Transaktivator unter der Kontrolle gewebespezifischer Promotoren exprimieren, in die Founderlinien können Tumore in Geweben wie der Bauchspeicheldrüse (Efrat et al., 1995) oder der Brustdrüse (Ewald et al., 1996) induziert werden.

Durch Verwendung des Östradiol-regulierbaren IRF-1-Fusionsproteins kann die Aktivität des Tumorsuppressors graduell reguliert werden und erlaubt zum einen die Untersuchung der IRF-1 Wirkung auf verschiedene Stadien der Tumorentwicklung, zum anderen eine Dosis-abhängige Untersuchung der IRF-1 Wirkung auf Tumore. Die Regulation von hER-Fusionsproteinen wurde in transgenen Tieren anhand der Cre-Rekombinase gezeigt. Cre-hER-Fusionsproteine zeigen eine Tamoxifen-abhängige sequenzspezifische Rekombination (Feil et al., 1996; Zhang et al., 1996). Allerdings wurde in den beschriebenen Fusionsproteinen eine Östrogenrezeptormutante verwendet (hER^T), die durch den Austausch einer Aminosäure nur durch den Östradiol-Antagonisten Tamoxifen aktivierbar ist während Östradiol nicht zu einer Aktivierung führt (Littelwood et al., 1995). Eine Aktivierung der hER^T -Fusionsproteine durch einen erhöhten Östradiolspiegel während der Schwangerschaft der Mäuse ist somit ausgeschlossen. Falls die geringe Anzahl der transgenen Nachkommen (Tab. 2.2) auf einen toxischen Effekt, verursacht durch die Basalexpression des tTA-Promotors und Aktivierung des IRF-1-hER-Fusionsproteins während der Schwangerschaft, zurück zuführen ist, wäre die Verwendung der hER^T -Mutante eine Alternative. Versuche mit IRF-1- hER^T -Fusionsproteinen zeigten aber eine vergleichsweise schwache Wirkung

dieser Fusionsproteine (Daten nicht gezeigt). Die Beobachtung, daß für die Aktivierung des IRF-1-hER-Fusionsprotein im Vergleich zu anderen hER-Fusionsproteinen höhere Östadiolkonzentrationen eingesetzt werden müssen und die Transktivierungsaktivität von hER^T-Fusionsproteinen geringer ist, könnten auf eine geringere Transaktivierungsfähigkeit des IRF-hERT-Fusionsproteins hinweisen. Die in IRF-1 identifizierten Repressionsdomäne könnte dafür die Ursache sein (Oumard et al., unveröffentlicht).

In dem hier beschriebenen Tumormodell kann die Transgenexpression durch die Bestimmung der SEAP-Aktivität im Serum der Tiere nachgewiesen werden. Auf diese Weise kann die Größe des Tumors an der SEAP-Konzentration im Blut abgelesen werden (Baasner et al., 1996). Zum anderen kann nach dem Tod der Tiere die Transgenexpression mit Hilfe des Reportergen eGFP lokalisiert werden, um zu überprüfen ob Tumorbildung bzw. Repression mit Transgenexpression übereinstimmt.

Das hier beschriebene Tumormodell zeigt einige Vorteile zur Untersuchung der tumorsuppressiven Eigenschaften von Tumorsuppressoren und Substanzen die zur Tumorthapie eingesetzt werden sollen gegenüber anderen Tumormodellen. Ein kritischer Faktor ist allerdings die IRES vermittelte Expression einiger Gene. Eine Expression in transgenen Tieren mit den hier verwendet IRES-Element von Polio Virus wurde bisher nicht beschrieben. Andere IRES-Elemente wurden allerdings schon erfolgreich eingesetzt.

3.6 Strategien zur Medikamentenentwicklung für die Krebstherapie

Mit den zur Zeit zur Verfügung stehenden Medikamenten können nicht alle Tumorerkrankungen wirksam behandelt werden. Ein Ziel der Pharmazeutischen Industrie ist es deshalb, neue Medikamente zu entwickeln. Bei der Entwicklung neuer Medikamente werden verschiedenen Strategien verwendet. Zum einen werden bereits etablierte Substanzen in neuen Einsatzgebieten getestet. Ein bekanntes Beispiel ist die Acetylsalizylsäure. Neben seiner schmerzhemmenden Wirkung wird diese Substanz mittlerweile auch bei der Heilung oder Prävention von anderen Erkrankungen wie Schlaganfall eingesetzt. Zum anderen wird versucht neue therapeutisch wirksame Leitstrukturen zu finden, die zur Weiterentwicklung von neuen Medikamenten genutzt werden können. Substanzen pflanzlichen, mikrobiologischen und chemischen Ursprungs bieten ein großes Potential neuer Leitstrukturen. Mit Hil-

fe von target-orientierten Screeningsystemen können im HTS therapeutisch wirksame Leitstrukturen gefunden werden. Vorteil solcher Screenings ist die Möglichkeit, große Substanzbanken mit unterschiedlichen Leitstrukturen in kurzer Zeit zu abzusuchen. Allerdings können in HTS nur spezifische Screeningsysteme eingesetzt werden. Für jedes neue Screening muß demzufolge ein neues System entwickelt werden. Wichtige Aspekte für target-orientierte Screenings sind: 1) die Definition von Targets; 2) die Evaluierung des Targets und 3) die Entwicklung von Screeningsystemen zum Auffinden der Leitstrukturen, die zu der Beeinflussung des Targets führen.

Targets können im Fall der Krebstherapie Onkogene und Tumorsuppressorgene sein, es können aber auch proapoptotische Gene, die zu einer Eliminierung transformierter Zellen führen, sein. Neben den schon bekannten Targets erfolgt das Auffinden neuer Targets durch verschiedene Methoden. Beispiele sind Differentialscreenings, in denen die Aktivität von Genen in transformierten und nicht-transformierten Zellen verglichen wird, funktionelle Ansätze, bei denen mittels Genfallen Gene identifiziert werden, deren Inaktivierung zur Transformation führen (Andreù et al., 1998), oder technische „knock-outs“ mit denen proapoptotische Genen gefunden werden können (Deiss et al., 1995). Der Transkriptionsfaktor IRF-1 wurde auf Grund seiner tumorsuppressiven Wirkung als molekulares Target definiert (Taniguchi et al., 1997). Die Wirkung von IRF-1 ist dabei unabhängig von der Art der Transformation durch Onkogene verschiedener Klassen (Abb. 2.5) und führt zusätzlich zu immunmodulatorischen Effekten wie die Stimulation von T-Helferzellen (Ducan et al., 1996) und der transkriptionellen Aktivierung von MHC-Genen (Hobart et al., 1996) und Genen die bei der Antigenpräsentation beteiligt sind. Für die Tumorthherapie ist die Fähigkeit, Apoptose in den Zellen zu induzieren ein wichtiges Phänomen. Viele Zytostatika induzieren in Tumorzellen Apoptose. Wie bereits beschrieben induziert IRF-1 in transformierten Zellen Apoptose, während in nicht-transformierte Zellen lediglich die Proliferation inhibiert wird (Abb. 2.10; Kirchhoff & Hauser, 1999). Dies stärkt die Vermutung, daß IRF-1 ein interessantes Target für die Tumorthherapie ist. Allerdings muß bedacht werden, daß für die Induktion der Apoptose das Vorhandensein bestimmter Proteine erforderlich ist. In E1A/ras transformierten Fibroblasten erfolgt die Induktion von Apoptose nur in Anwesenheit von p53 (Lowe et al., 1993). Gerade p53 ist aber in humanen Tumoren häufig deletiert und führt zu einer schlechteren Prognose bei der Behandlung.

Neben der Evaluierung des Targets ist die Entwicklung des Screeningsystems, mit dem die neuen Leitstrukturen im HTS gefunden werden sollen ein wichtiger Aspekt. Mit der in dieser Arbeit beschriebenen Zelllinie ist es gelungen ein Screeningsystem zu entwickeln, welches die spezifische Aktivierung eines IRF-1-responsiven Reporterelements durch IRF-1-Induktoren, -Aktivatoren und -Agonisten erlaubt.

4 Methoden

4.1 Geräte

Tischzentrifugen:	Heraeus Biofuge 13 Sigma - 202 MK
Kühlzentrifugen:	Sorval Superspeed RC5-C Festwinkelrotoren: GSA, GS3, SS34 Heraeus Minifuge GL 2150 und 6000
Ultrazentrifugen:	Sorval OTD combi Festwinkelrotor: Ti60, Ti75, Ti1270, VTI65
Speedvac concentrator:	Savant Instruments Inc. mit Ölschieber-Vakuumpumpe und Kühlfalle
Geltrockner:	Bio-Rad 224 und 1125 mit Ölschieber-Vakuumpumpe und Kühlfalle
Kontaminationsmonitor:	Berthold LB 1210 C/B
Szintillationszähler:	Beckmann LS 1701
Luminometer:	Berthold Lumat LB 9501
Photometer:	Hitachi U 1100
Fluorometer:	Hoefer TKO 100
ELISA-Reader:	Labsystems Multiskan MS Dynatech MR5000, computerunterstützt
DNA Thermal Cycler:	Perkin-Elmer Cetus 480
Netzgeräte:	Bachofer 300/0,4 Hemlab Power Supply Type 264 Pharmacia ECPS 3000 / 150 LifeTechnologies ST305
Horizontal-Elektrophorese:	BRL H3 und H6 BRL Horizon 58 und Horizon 11-14
Vertikal-Elektrophorese:	BRL S2 und V16 BioRad Mini-Protean II
Blottapparatur:	BioRad Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell

UV-Beleuchtungskammer:	Appligene mit 302 nm
Gelfotographie/Scanning:	Herolab EasyStore
PhosphorImaging:	Molecular Dynamics PhosphorImager STORM
Cleanbenches:	Heraeus Lamin Air HLB 2448 The Baker Co. Inc. Sterilcard Hood VBM 600
Zellkultur-Inkubatoren:	Heraeus B 5060 EK-002 Forma Scientific Water-jacked Inkubator 3325
Mikroskope:	Leitz Labovert Olympus CK2 Zeiss Axiovert TV135 mit Fluoreszenzvorrichtung Zeiss Axiophot mit Fluoreszenzvorrichtung
CCD-Kamera-System:	Photometrics PXL 1400 (Grade 2)
Elektrotransformator:	BioRad Gene Pulser
Exponierkammer:	Agfa Gevaert 30 cm x 40 cm
Verstärkerfolien:	Curix MR 600 SE6
Wasseraufbereitungsanlage:	Millipore Milli-Q

4.2 Material

4.2.1 Filterpapiere und Transfermembranen

Sterilfiltration:	Sartorius Membranfilter, Porengröße 0,45 µm und 0,22 µm, d = 47 mm
Nylonmembran:	Zeta-Probe, Fa. BioRad Gene-Screen-Plus, Fa. DuPont
Chromatographiepapier:	Whatman 3MM
DEAE-Papier:	Whatman DE/81

4.2.2 Autoradiographie

Filmmaterial:	Kodak Royal X-Ray Film XR 5 Agfa Gevaert Curix X-Ray Film Amersham Hyperfilm ECL
---------------	--

4.2.3 Chemikalien

Es wurden Chemikalien der Firmen Bayer, Biolabs, BioRad, Boehringer, BRL Difco, Gibco, Merck, Miles, Renner, Roth, Pharmacia, Qiagen, Seromed, Serva und Sigma verwendet. Die Enzyme lieferten Biolabs, Boehringer, BRL, Merck, Perkin-Elmer, Promega, Serva und USB. Antikörper wurden von Transduction Laboratories, Santa Cruz, Sigma und Dianova bezogen. Oligonukleotide wurden von der DNA-Synthese-Gruppe der GBF erhalten bzw. von den Firmen Gibco und MWG bezogen. Radioaktive Chemikalien wurden von Amersham-Buchler bezogen.

4.2.4 Zellkulturmaterialien

Das Plastik-Zellkulturmaterial für eukaryontische Zellen wurde von den Firmen Costar, Gibco, Nunc und Seromed bezogen.

4.2.5 Computerprogramme

Die Texte und Abbildungen dieser Arbeit wurden mit Hilfe des Programmpaketes *Microsoft Office 7.0* erstellt. *VCH Biblio 2.2* diente der Literaturverwaltung. Zur Literaturrecherche diente *Medline* und *Current Contents*.

Zur Durchführung von Sequenzanalysen und Restriktionskartierungen wurde das GBF Programmpaket *GENMON 4.4* und *GCG 7.0* von der Genetics Computergroup und *Vector NTI 4.0* von ATCC verwendet. Als Datenbanken dienten *EMBL 29.0*, *SWISSPORT 20.0* und *GENBANK 70.0*. Die Auswertung von Autoradiographien erfolgte mit *Image Quant Version 3.3* von Molecular Dynamics. Die Bearbeitung der CCD-Kamera Aufnahmen erfolgte mit den Programmen *IPLab Spectrum* von Signal Analytics und *HazeBuster* von VayTek, Inc.

4.3 Allgemeine Methoden

(nach Maniatis et al., 1982)

4.3.1 Sterilisation

Glasgeräte werden vor Gebrauch 4 Stunden bei 180°C hitzesterilisiert.

Alle Lösungen werden sterilfiltriert (0,22 µm Filter) oder autoklaviert (20 Minuten, 121°C, 1 bar).

4.3.2 Phenolisieren von Nukleinsäuren

Phenol (Fa. Roth) : redestilliertes, in TE äquilibriertes Phenol, pH 7,5-8,0, Zusatz von 0,1% (w/v) 8-Hydroxychinolin

TE : 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1mM EDTA, pH 8,0

Die wäßrige Nukleinsäurelösung wird im Eppendorfgefäß mit 1 v/v an Phenol versetzt und auf dem Vortex-Mixer gemischt. Zur Phasentrennung ist eine kurze Zentrifugation notwendig. Vor Verwendung der DNA werden Phenolreste durch mehrfaches Extrahieren mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) entfernt. Den letzten Reinigungsschritt bildet eine gründliche Dialyse (bei hochmolekularer DNA) bzw. eine Fällung mit 2 Volumen 0,6 M LiCl in Ethanol. Das erhaltene Präzipitat wird zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE aufgenommen.

4.3.3 Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren

Zur Fällung versetzt man 1 Volumen wäßriger DNA-Lösung mit 2 Volumen 0,6 M LiCl in Ethanol, fällt für 10 Minuten bei 4°C und zentrifugiert anschließend 5 bis 30 Minuten mit 13000 UpM bei 4°C. Das Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen und im Vakuum oder bei 37°C getrocknet.

Neben Ethanol kann auch Isopropanol zur DNA-Fällung benutzt werden, wobei das 0,6 fache Volumen der DNA-Lösung eingesetzt wird.

4.3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

4.3.4.1 Photometrische Bestimmung

Die Extinktion der Nukleinsäure wird photometrisch bei 260 nm bestimmt. Eine Extinktion von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Das Verhältnis der Extinktion gemessen bei 260 nm zu der bei 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) sollte für eine sorgfältig präparierte Nukleinsäure bei 1,8 liegen, das Verhältnis OD_{260} zu OD_{230} bei 2,25.

4.3.4.2 Fluorimetrische Bestimmung

Zur fluorometrischen Konzentrationsbestimmung wird die DNA mit dem spezifischen Fluoreszenz-Farbstoff HOECHST 33258 angefärbt. Die Anregungswellenlänge für den

DNA-Farbstoff-Komplex beträgt 356 nm, die Emission findet bei 460 nm statt. Die Messung erfolgt im HOEFER-Fluorometer und kann nach Kalibrierung mit einer definiert konzentrierten DNA-Lösung direkt in µg/ml abgelesen werden.

Erfahrungsgemäß ergibt diese Art der Konzentrationsbestimmung niedrigere, aber genauere Werte, da die Messung nicht von der Proteinabsorption überlagert wird und von Verunreinigungen (RNA) weitgehend unabhängig ist.

4.4 Arbeiten mit *E.coli*

4.4.1 Verwendete *E.coli* Stämme

DH5α: F⁻, endA1, hsdR17(r⁻, m⁺), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, Δ(argF-lacZYA)U169, φ80lacZΔM15 (Hanahan, 1983)

DH10B: mcrA, mcrB, mrr, hsdR17, deoR, recA1, endA1, lacZDM15 (Gibco BRL)

Shure: Δ(hsdRMS), mcrA, mcrB, mrr, endA1, supE44, thi-1, λ⁻, gyrA96, relA1, lac, recB, recJ, sbcC, umuC, uvrC, [F', proAB, lacI^qZΔM15, Tn10, (tet^R)] (Bullock et al., 1987)

4.4.2 Kulturmedien für Bakterien

LB-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton
10 g/l Bacto-Hefeextrakt
5 g/l NaCl

TB-Medium: 12 g/l Bacto-Trypton
24 g/l Bacto-Hefeextrakt
4 ml/l Glycerin
0,017 M KH₂PO₄
0,072 M K₂HPO₄

Agarplatten: Dem Medium werden 15 g Agar (Difco) pro Liter LB-Medium zugegeben.

Zur Herstellung ampicillinhaltiger Agarplatten wird nach Abkühlen des Mediums auf etwa 45°C ¹/₁₀₀₀ Volumen Ampicillin einer sterilfiltrierten Stammlösung mit 5 mg/ml beigemischt.

4.4.3 Kultivierung von *E.coli*

E.coli-Zellen werden in Flüssigmedien (LB oder TB \pm Antibiotikum) bei 37°C unter Schütteln angezogen. Dazu werden 2 ml Kulturmedium mit einer *E.coli* Kolonie (Einzelklone von Agarplatte) angeimpft. Nach 6-8 Stunden kann mit dieser Vorkultur die Hauptkultur in einem Verhältnis von 1:500 bis 1:1000 angeimpft werden.

4.4.4 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

1 l LB-Medium wird mit 10 ml einer Vorkultur des Bakterienstammes angeimpft und bei 37°C im Erlenmeyerkolben mit Schikane geschüttelt. Sind die Zellen zu einer OD₆₀₀ von 0,7 bis 0,8 gewachsen, werden sie in sterile GS3-Röhrchen für 15 bis 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wird 10 min bei 4°C im GS3-Rotor (4000 UpM) zentrifugiert. Das Pellet wird in 1 l kaltem, sterilen H₂O vorsichtig suspendiert, 15 bis 30 min auf Eis inkubiert und nochmals zentrifugiert. Nun wird mit 0,5 l H₂O erneut gewaschen. Das Pellet wird nach der Zentrifugation in 20 ml 10 %igem, kaltem, sterilen Glycerin suspendiert, auf Eis inkubiert und zentrifugiert. Zum Schluß wird es in 3 ml 10 %igem Glycerin suspendiert und in 50 µl Aliquots zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Zellen werden bei -70°C gelagert.

4.4.5 Elektrotransformation von *E.coli*

Nach dem Auftauen (auf Eis) werden die kompetenten Zellen (50 µl) mit z.B. 1 µl Ligationsansatz (ca. 1 ng Vektor-DNA) in sterile, trockene und gekühlte Elektrotransformationsküvetten gegeben und bei einer Spannung von 2,5 V, einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 200Ω transformiert. Sofort nach der Transformation wird 1 ml SOG-Medium in die Küvette gegeben. Der Transformationsansatz wird für 30 min bis 1 h bei 37°C geschüttelt. Die Zellen werden in 100 µl Portionen und/oder Verdünnungen auf entsprechenden antibiotikahaltigen LB-Agarplatten mit einem Drigalski-Spatel ausplattiert.

SOB: 2 % Bacto-Trypton, 0,5 % Bacto-Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM, MgCl₂, 10 mM MgSO₄. Die Mg-Salze werden separat sterilisiert und erst vor Gebrauch der Stammlösung zugesetzt.

SOG: SOB mit 20 mM Glukose.

4.4.6 Anlage von Stammkulturen

Zur kurzfristigen Lagerung werden die Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen, bei 37°C über Nacht inkubiert und im Kühlraum bei 4°C aufbewahrt. Eine langfristige Lagerung ist als Stammkultur möglich. Hierzu wird 87 %iges Glycerin im Verhältnis 1:1 mit einer Übernachtkultur gemischt und direkt im Anschluß bei -20°C oder -70°C gelagert.

4.5 Isolierung von Nukleinsäuren

4.5.1 Plasmidisolierung im analytischen Maßstab

4.5.1.1 „Boiling Prep“

(nach Dan Cimbora, FHCR, Seattel)

Diese Methode eignet sich zur DNA-Isolierung für alle *E.coli* Laborstämme (DH5 α , DH10B, XL1Blue), außer für CMK 603(recA+). Vorteile liegen in der schnellen Durchführung (etwa 30 min) und in der hohen Qualität der DNA. (basiert auf 'Boiling Prep' nach Holmes & Quigley).

STET: 8% Sucrose

0,5% Triton

50 mM EDTA

10 mM Tris (pH8)

LTE: 10 mg Lysozym/ 1 ml TE

7,5 M NH₄OAc

TER: 10 µg RNase A/ 1 ml TE

Autoklavierte Zahnstocher

Eine *E.coli* 2 ml LB/TB-Kultur mit dem entsprechenden Antibiotikum wird für 4 bis 16 h bei 37°C geschüttelt. Nach Umfüllen in 2,2 ml-Eppendorfgefäße werden die Proben für 1 min bei 5000 UpM zentrifugiert. Die Pellets werden in je 500 µl STET-Puffer suspendiert und mit 50 µl LTE (10 mg/ml, bei -20°C lagern) versetzt. Nach einer Inkubation von 2-3 min bei RT werden die Proben 90s in einen Eppendorf Thermomixer bei 95°C inkubiert. Nach 5 minütiger Zentrifugation (14000 UpM) bildet sich ein zähflüssiges Pellet, das mit einem Zahnstocher entfernt wird. Es werden 50 µl 7,5 M NH₄OAc und 500 µl Isopropanol

zugefügt, gevortext und die DNA für 5 min bei 14000 UpM pelletiert. Nach einem kurzem Trocknen wird das Pellet in 100 µl TER-Lösung (RNase A 10 µg/ml) aufgenommen. Es werden 5µl zur Restriktionsanalyse eingesetzt.

4.5.1.2 „Mini“-Plasmidpräparation

(nach Birnboim & Doly, 1979; verändert nach G. Morelle, unveröffentlicht)

Zellsuspensionspuffer :	50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA autoklavieren oder sterilfiltrieren
Denaturierungslösung :	0,2 M NaOH, 1% SDS (frisch angesetzt)
Renaturierungslösung :	7,5 M NH ₄ OAc

Es werden 2 ml Kulturen (LB + Ampicillin) von den zu untersuchenden Klonen angelegt und in Kapsenberggröhrchen über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach dem Umfüllen in 2,2 ml Eppendorfreaktionsgefäße werden die Proben für 1 Minute bei 8000 UpM zentrifugiert. Die Pellets werden in je 200 µl Lysozymlösung aufgenommen, gut gemischt (Vortex) und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt die Zugabe von je 400 µl Denaturierungslösung, die ebenfalls gut vermischt werden muß. Die Proben werden anschließend 5 Minuten im Eisbad belassen. Daraufhin werden je 300 µl Renaturierungslösung zugegeben (gut mischen) und 10 Minuten im Eisbad inkubiert. Man erhält einen flockigen, weißen Niederschlag, der durch 5-minütige Zentrifugation bei 4°C und 10000 UpM abgetrennt wird. Im Pellet bleiben genomische DNA, RNA, Proteine und Membranfragmente. Der klare Überstand wird vorsichtig abpipettiert (ca. 720 µl) und durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol wird die Plasmid DNA gefällt. Die Proben werden gut gemischt, 10 Minuten bei Raumtemperatur belassen und anschließend 10 Minuten bei 13000 UpM zentrifugiert. Die Pellets werden einmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen und leicht getrocknet. Die DNA wird in 50 - 100 µl TE + 1 µl RNaseA (1 mg/ml) aufgenommen. Für Restriktionsanalysen können 5 - 10 µl eingesetzt werden.

4.5.2 Präparative Plasmidisolierung

(nach Ish-Horowitz & Burk, 1981)

1 Liter TB-Medium werden mit einer Vorkultur 1:1000 angeimpft. Die *E.coli*-Zellen werden über Nacht bei 37°C angezogen. Die Zellen werden durch Zentrifugation für 8 Minuten

bei 7000 UpM im GS 3 Rotor geerntet und in 36 ml Lysozypuffer resuspendiert. Durch Zugabe von 4 ml Lysozymlösung (40 mg/ml in Lysozypuffer) werden die Zellen 10 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Nach Zufügen von 80 ml Denaturierungslösung verbleibt die Lösung für 5 Minuten auf Eis. Anschließend werden 40 ml 3 M K-Acetat (pH 4,8) hinzugegeben, geschüttelt und 15 Minuten auf Eis inkubiert, wobei die Proteine ausfallen. Diese werden durch 10-minütige Zentrifugation bei 8000 UpM im GS 3 Rotor abgetrennt. Der Überstand wird durch ein Zellstofftuch filtriert, die darin enthaltenen Nukleinsäuren durch Zugabe von 0,7 Vol% Isopropanol gefällt und 10 Minuten im GS 3 Rotor bei 8000 UpM abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 9 ml TE 10/10 gelöst. Mit 2 M Tris/Base (pH 12) wird der pH auf 7,0 eingestellt. In einem Corex-Röhrchen werden 10 g CsCl eingewogen. Unter erwärmen werden die ca. 10 ml Plasmid-DNA-Lösung in dem CsCl gelöst. Nach der Zugabe und dem Mischen mit 500 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) wird der Ansatz mindestens 10 Minuten im Dunkeln aufbewahrt. Um die verbliebenen, jetzt präzipitierten Proteine und Ribonukleinsäuren zu sedimentieren wird 10 Minuten bei 10000 UpM bei 18°C im SS 34 Rotor zentrifugiert. Der Überstand wird in Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend werden die Zentrifugenröhrchen verschweißt. Es wird 40 h bei 50000 UpM (Ti1270-Rotor) oder 40 h bei 38000 UpM (Ti60-Rotor) oder 24 h bei 50000 UpM (Ti75-Rotor) bei 18°C zentrifugiert. Nach Beendigung der Zentrifugation wird die im UV-Licht sichtbare Plasmid-Bande mit einer Spritze abgezogen (über der Plasmid-Bande kann sich noch eine Bande mit Resten chromosomaler DNA befinden).

Soll die isolierte Plasmid-DNA für Transfektionsexperimente benutzt werden, so folgt eine weitere Aufreinigung der DNA über einen zweiten CsCl-Gradienten. Die Lösung mit der Plasmid-DNA wird dazu in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben, mit CsCl-Lösung (1 mg/ml) auf 12 ml aufgefüllt und noch einmal für 24 Stunden (Ti1270- oder VTI65-Rotor) zentrifugiert. Anschließend wird die Plasmid-DNA abgezogen, das Ethidiumbromid mit NaCl-gesättigtem Isopropanol mehrfach extrahiert und gegen 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) und 1 mM EDTA bei mehrfachem Pufferwechsel dialysiert.

4.5.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

4.5.3.1 „QIAquick“ Gel Extraktions Kit

Das Prinzip der Extraktion beruht auf der DNA-Bindung an eine Silica-Membran in Gegenwart von Hochsalzpuffern, während Verunreinigungen aus der Säule ausgewaschen werden. Anschließend wird die DNA mit TE oder H₂O eluiert.

Die zu isolierende Bande wird aus dem Agarosegel ausgeschnitten und nach dem Protokoll des Herstellers Qiagen über eine Säule gereinigt.

4.5.3.2 „QIAEXII“ Gel Extraktions Kit

Die Extraktion der DNA beruht wie schon in 4.5.3.1 beschrieben auf der DNA-Bindung an Silika in Gegenwart von Hochsalzpuffern. Im Gegensatz zum QIAquick Gel Extraktions Kit werden Silika-Partikel verwendet, die eine bevorzugte Bindung von sehr kleinen (40 bis 50 bp) und sehr großen (≥ 4000 bp) DNA-Fragmenten aufweisen.

Die zu isolierende DNA wird aus dem Agarosegel ausgeschnitten und nach Angaben des Herstellers mit Hilfe der Silika-Partikel aufgereinigt.

4.5.4 Isolierung von hochmolekularer DNA (HMW-DNA) aus Säugerzellen

5x Proteinase K-Puffer: 5 % SDS, 80 mM EDTA, 0,4 M Tris/HCl (pH 7,5)

Proteinase K-Lösung: 10 mg/ml in 1x Proteinase K-Puffer

Konfluent gewachsene Zellen einer großen Platte (141 cm²) werden abgelöst und in einem 50 ml-Röhrchen pelletiert. Die Zellen werden in 2 ml PBS resuspendiert. Anschließend werden 8 ml 1.2 x Proteinase K-Puffer und 100 µl Proteinase K (Endkonz. 100 µg/ml) zugegeben und über Nacht bei 37°C am Rotor drehend inkubiert. Zum Ansatz wird 1 Vol Phenol zugegeben und 60 min bei RT "end over end" gedreht. Danach wird 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) und $\frac{1}{10}$ Vol 3 M NaAc zugegeben und der Ansatz weitere 30 min rotiert. In der Minifuge werden bei 3000 UpM für 10 min die Phasen getrennt. Die wäßrige Oberphase enthält die HMW-DNA. Sie wird ohne Interphase abgenommen und in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt. Die Extraktion wird wiederholt: 1 Vol Phenol, 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol und $\frac{1}{10}$ Vol 3 M NaAc zugeben, 30 min bei RT drehen. Zur Phasentrennung zentrifugieren. Die wäßrige Oberphase wird ohne Interphase abnom-

men, mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und zentrifugiert. DNA-Lösung erneut mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahieren. Die DNA in der wäßrigen Oberphase wird mit 1,5 Vol Isopropanol gefällt. Dazu wird das Röhrchen eine Minute waagrecht bewegt, bis die HMW-DNA in Form weißer Fäden ausfällt und langsam verklumpt. Sie wird abzentrifugiert, und das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach Zugabe von ca. 5 ml TE (pH 7,5) wird die Probe über Nacht auf dem Rocker bewegt, damit sich die HMW-DNA lösen kann.

Carrier-DNA für Transfektionen wird durch ca. 7-maliges Aufziehen in einer 21-gauge Kanüle auf eine mittlere Länge von 20 kb gesichert. Die DNA wird bei 4°C gelagert.

4.5.5 Isolierung hochmolekularer DNA aus Mausschwänzen

Tail-Puffer: 50 mM Tris, pH 8.0
100 mM EDTA
100 mM NaCl
1% SDS

1 bis 1,5 cm Mäuseschwanz werden mit 750 µl Tail-Puffer und 50 µl ProteinaseK-Lösung versetzt und über Nacht bei 55°C inkubiert. Anschließend werden je 400 µl Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol zugegeben und gut gemischt. Der Ansatz wird 15 Minuten bei 4°C und 15.000 UpM zentrifugiert und die obere wäßrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 1 ml eiskaltem Isopropanol wird der Ansatz bis zum ausfallen der DNA vorsichtig geschüttelt. Anschließend wird die DNA 10 Minuten bei 15.000 UpM pelletiert und zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Die isolierte DNA wird bei Raumtemperatur getrocknet und in 30 µl TE aufgenommen, so daß die DNA-Konzentration ja nach Länge des Schwanzes zwischen 0,5- 0,8 µg/µl beträgt. Die so erhaltene HMW-DNA kann direkt für den Restriktionsansatz und anschließende Southern-Blot-Analysen eingesetzt werden, es empfiehlt sich der Einsatz von 15 µl DNA.

4.5.6 Isolierung von RNA aus Säugerzellen

4.5.6.1 Isolierung von Gesamt-RNA

TEN : 40 mM Tris/HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA

2x Bindungspuffer :	20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 M LiCl, 2 mM EDTA
Waschpuffer :	10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 0,15 M LiCl, 1 mM EDTA
Elutionspuffer :	2 mM EDTA, pH 7,5
1x Auftragspuffer für RNA-Gel :	0,75 ml deionisiertes Formamid, 0,15 ml 10x MOPS, 0,24 ml Formaldehyd, 0,1 ml H ₂ O, 0,08 ml Bromphenolblaulösung (10%)

TRIZOL-Reagenz (Fa. Life Technologies)

Mindestens 1×10^6 Zellen werden mehrfach mit PBS gewaschen und mit TEN geerntet. Nach dem Zentrifugieren (5 Minuten, 1000 UpM) kann das Pellet bei -70°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet werden. Das Zellpellet wird mit 500 µl TRIZOL resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Chloroform mischt man kurz und läßt den Ansatz für 2 bis 3 Minuten bei Raumtemperatur stehen. Zur Phasentrennung wird nun für 15 Minuten bei 4°C und 12000 g zentrifugiert. Ist die obere wäßrige Phase klar, so wird sie vorsichtig abgezogen. Sollte sie nicht klar sein, muß der Ansatz noch weiter geschüttelt werden. 250 µl Überstand werden mit 250 µl Isopropanol gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wird wiederum wie vorher zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgezogen und die RNA, die als gelartiges Pellet erkennbar wird mit 75% Ethanol gewaschen. Nun folgt ein 10minütiger Zentrifugationsschritt bei 4°C und 8000 g. Das Ethanol wird vorsichtig entfernt, die RNA 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in 100 µl H₂O aufgenommen.

4.5.6.2 Isolierung von Poly (A)⁺ RNA mit Hilfe von Dynabeads (dT)₂₅

Dynabeads Oligo (dT)₂₅ (Fa. Dynal)

Magnethalter Dynal MPC-E

100 µl Dynabeads werden in RNase freie Eppendorfgefäße pipettiert, in den Magnethalter gestellt und der Lagerungspuffer vorsichtig abpipettiert. Nun werden die Beads zweimal in 2x Bindungspuffer resuspendiert. Die in H₂O aufgenommene RNA wird 2 Minuten auf 65°C erhitzt, 2 Minuten auf Eis belassen und dann mit den vorbereiteten Beads vermischt. Es folgt ein 5 minütiger Inkubationsschritt bei Raumtemperatur. Die Beads werden in den Magneten gestellt, der Überstand abpipettiert und die Beads anschließend zweimal mit 2x Waschpuffer gewaschen, wobei die Überstände jeweils sorgfältig entfernt werden. Die

Elution erfolgt durch Zugabe von 10 µl Auftragspuffer auf die Beads und Inkubation für 2 Minuten bei 65°C. Der Überstand wird abgenommen und nach Zugabe von 1 µl Ethidiumbromidlösung (400 µg/ml) sofort auf ein RNA- Gel aufgetragen. Die Beads können nach Angaben des Herstellers regeneriert werden.

4.6 Modifikation von Nukleinsäuren

4.6.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die DNA in einer Konzentration von bis zu 1 µg/µl wird in dem vom Hersteller angegebenen Puffer bei der angegebenen Temperatur (zumeist 37°C) gespalten. Nach Überprüfung der Vollständigkeit der Spaltung wird die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA bzw. durch Phenolisierung gestoppt.

4.6.2 Auffüllen 5'-überstehender Enden

Durch Spaltungen mit Restriktionsenzymen entstehen oft überstehende Enden, die nicht miteinander kompatibel sind. Die Ligation kann nur erfolgen, wenn diese zu glatten Enden modifiziert worden sind.

Das aus der Polymerase I durch Subtilisin-Behandlung gewonnene Klenow-Enzym besitzt die 3'-5'-Exonuklease- und die 5'→3'- Polymerase-Aktivität (5'→3'-Exonukleaseaktivität fehlt) und füllt mit dNTP's die komplementären Basen des 5'-überstehenden DNA-Stranges auf.

10 x Klenow-Puffer: 50 mM Tris/HCl (pH 7,2)

 10 mM MgSO₄

 0,1 mM DTT

Nukleotide: 10 mM dNTP

Ein Ansatz von 50 µl enthält bis zu 5 pmol überstehende 5'-Enden (bis zu 1 µg DNA), alle dNTPs in einer Endkonzentration von 100 - 200 µM, 1 x Klenow-Puffer und 1-2 Einheiten des Klenow-Enzyms. Die Inkubation erfolgt 15 Minuten bei Raumtemperatur oder bei 30°C. Der Ansatz wird phenolisiert, gefällt und in TE Puffer aufgenommen.

4.6.3 Dephosphorylierung

Zur radioaktiven Markierung des 5'-Endes eines Fragments oder um bei einer Ligation eine Selbstligation zu verhindern, werden überstehende 5'- oder 3'-Enden der DNA-Fragmente mit alkalischer Phosphatase (calf intestine phosphatase = CIP) dephosphoryliert.

10 x Phosphatase-Puffer: 500 mM Tris/HCl (pH 9,0)
10 mM MgCl₂; 1 mM ZnCl₂
1 mM Spermidin

Zur Dephosphorylierung überstehender 5'-Enden werden in einem Reaktionsansatz von 50 µl Endvolumen 5 µl 10 x Phosphatase-Puffer, 20 - 100 pmol überstehende 5'-Enden und 1 Unit alkalische Phosphatase 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 µl 125 mM EDTA, 1 % SDS gestoppt oder durch Inkubation bei 65°C für 10 Minuten inaktiviert.

Zur Dephosphorylierung gleich langer 5'- und 3'-Enden oder überstehender 3'-Enden wird der gleiche Reaktionsansatz erstellt. Der Ansatz wird aber 15 Minuten bei 37°C und anschließend 15 Minuten bei 56°C inkubiert. Nach einer nochmaligen Zugabe von 1 Unit alkalischer Phosphatase werden die Inkubationschritte wiederholt.

4.6.4 Ligasereaktion

Bei der Ligation verknüpft die T₄-DNA-Ligase DNA-Fragmente, die sowohl kompatible, überstehende als auch glatte Enden besitzen. Dabei kommt es zu einer Phosphodiester-Bindung zwischen den 3'-OH- und den 5'-P-Enden der DNA.

5 x Ligase-Puffer: 250 mM Tris/HCl pH 7,6
50 mM MgCl₂
25% (w/v) PEG 8000
5 mM ATP
5 mM DTT

Für die Ligation überstehender, kompatibler Enden werden in einem 10 µl Ansatz ca. 20 fmol eines zuvor gegebenenfalls dephosphorylierten Vektors mit ca. 60 fmol eines DNA-Fragments, 2 µl 5 x Ligase-Puffer und 2 U T₄-DNA-Ligase eingesetzt. Inkubiert wird mindestens 5 Stunden bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht. Überstehende, komplementäre Enden werden relativ schnell und vollständig verknüpft, glatte 3'- und 5'-Enden

erfordern eine höhere Enzymkonzentration. Bei der Ligation mit synthetischen Oligonukleotiden wird mit der 1000-fachen molaren Menge des Fragments ligiert.

4.6.5 Radiaktive Markierung von Nukleinsäuren

Bei diesem Verfahren wird ein kommerziell angebotenes System der Firma Amersham verwendet. Der Reaktionsmix liegt in einem Eppendorfreaktionsgefäß in gefriergetrockneter Form vor. Es werden nur noch 1-100 ng DNA-Probe, die zuvor für 5 min bei 95°C denaturiert wurde, und 5 µl ^{32}P dCTP zugegeben. Der Mix wird für 15 min bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion werden 2,5 µl 0,5 M EDTA zugegeben.

Nach der Markierungsreaktion wird die Probe über eine Sephadex G50-Säule von nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt. Hierzu wird der Auslauf einer silikonisierten, sterilisierten Pasteurpipette mit ebenso vorbehandelter Glaswolle abgedichtet und mit Sephadex G50 (suspendiert in TE und autoklaviert) gefüllt. Die Fraktionen werden im Szintillationszähler vermessen.

4.6.6 „Southern Blotting“

(nach Southern, 1975)

4.6.6.1 Transfer

10 µg der aufgereinigten, hochmolekularen DNA werden mit 2 µl des jeweiligen 10fachen Restriktionspuffers, 0,5 µl TE/RNase (10µg/ml) sowie 20 U des Restriktionsenzym versetzt und über Nacht im Gesamtvolumen von 20 µL bei 37 C inkubiert. Danach wird die DNA direkt mit 5 µl 6xProbenpuffer versetzt und elektrophoretisch in einem 0,8 bis 1,2% TAE-Agarosegel aufgetrennt; als Größenstandard wird ein ^{35}S -markierter Verdau von Lambda-DNA verwendet. Bei all diesen Schritten ist es wichtig auf eine intensive Durchmischung der eingesetzten, teilweise viskosen Lösungen zu achten. Ebenso sollten zur Elektrophorese nur frisch angesetzte Puffer zu verwenden.

Der Transfer der DNA vom Gel auf die positiv geladene Nylonmembran (Zeta-Probe, Fa. BioRad) erfolgt mit 0,4 M NaOH. Lange DNA-Fragmente (>5 kb) können vor dem Transfer mittels 0,25 M HCl (ca. 30 Minuten) depuriniert werden, so daß sie während des alkalischen Transfers in Teilfragmente zerfallen und leichter aus dem Gel austreten können. Das Gel wird anschließend mit 0,4 M NaOH neutralisiert und in die Blotappatur (z.B. eine

Gelkammer) überführt: das Gel liegt mit der Unterseite nach oben oberhalb des Flüssigkeitsspiegels auf einem feuchten, exakt auf Gelbreite zugeschnittenen Filterpapierstreifen (Whatman 3MM), dessen gegenüberliegende Ränder in das Pufferreservoir (0,4 M NaOH) eintauchen. Unter dem Filterpapier sollten ein Schwammtuch oder mehrere Lagen Filterpapier liegen, die nicht mit der Flüssigkeit in Berührung stehen. Auf das Gel wird die Nylonfolie gelegt, die zuvor in H₂O gewässert wurde. Luftblasen zwischen Gel und Membran sind sorgfältig zu entfernen. Auf die Membran werden zwei Lagen mit 0,4 N NaOH angefeuchtetes und 5 Lagen trockenes Filterpapier geschichtet. Nach oben schließt ein Stapel saugfähiges Papier (z.B. "Apura Swanex") die Anordnung ab.

Die Apparatur wird vorsichtig mit Plastikfolie abgedeckt und eine Glasplatte sowie ein Gewicht (ca. 500 g) aufgelegt. Der Transfer sollte mindestens 6 Stunden, meist jedoch über Nacht erfolgen. Bei Durchfeuchtung sollte der Papierstapel gewechselt werden. Anschließend wird die Nylonfolie in 2xSSC neutralisiert und in noch feuchtem Zustand zur Hybridisierung weiter verwendet. Eine weitergehende Fixierung der DNA auf der Membran ist nicht nötig.

4.6.6.2 Hybridisierung

Hybridisierungslösung:	0,5M Na _x H _x PO ₄ , pH 7,2 7 % SDS 2 mM EDTA
Waschlösung I:	40 mM Na _x H _x PO ₄ , pH 7,2 1 % SDS 2 mM EDTA
Waschlösung II:	40 mM Na _x H _x PO ₄ , pH 7,2 0,1 % SDS 2 mM EDTA
Waschlösung III:	100 mM Na _x H _x PO ₄ , pH 7,2 2 mM EDTA

Prähybridisierung und Hybridisierung:

5 ml der Hybridisierungslösung werden in ein Glasröhrchen für den Hybridisierungssofen gefüllt und die Membran mit der DNA-freien Seite an die Glaswand eingelegt. Die Prä-

hybridisierung erfolgt bei 68 °C im Hybridisierungssofen für mindestens 10 Minuten. Die denaturierte radioaktiv markierte Probe wird hinzugefügt und die Hybridisierung erfolgt bei gleichen Bedingungen über Nacht. Die Oberfläche der Membran darf durch zu grobe Handhabung nicht verletzt werden, desweiteren sollten sich zwischen Membranrückseite und Glaswand keine Luftblasen befinden.

Waschen:

Der Röhrcheninhalt wird in den radioaktiven Abfall entleert und die Membran vorsichtig entnommen. Die folgenden Waschschriffe erfolgen im Wasserbad bei 68 °C.

2x 5 Minuten mit Waschlösung I

1x 5 Minuten mit Waschlösung II

3x 5 Minuten mit Waschlösung III (zum Entfernen von SDS-Resten)

Anschließend kann die Membran feucht in Klarsichtfolie eingeschlagen und exponiert werden. Trocknen der Membran führt zu irreversibler Bindung und macht nachträgliches Waschen und Rehybridisieren unmöglich.

Rehybridisierung:

Zur Rehybridisierung wird die Aktivität durch mehrfaches Waschen in 0,1 % SSC/0,1 % SDS bei 95 °C entfernt. Die vollständige Ablösung der radioaktiven Probe wird durch anschließende Exposition sichergestellt. Erneute Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgen wie gehabt.

4.6.7 Northern Transfer

Das Formaldehyd-Agarosegel wird 5 Minuten in H₂O und anschließend zweimal 15 Minuten in 10x SSC geschwenkt. Danach erfolgt der Aufbau der Blotapparatur analog zum Southern Transfer, allerdings erfolgt der Transfer in diesem Fall mit 10x SSC über Nacht. Als Membran dient eine Nylonfolie (Gene Screen Plus, NEN), die vor Gebrauch kurz in H₂O angefeuchtet wird. Nach dem Transfer wird die Membran mehrfach in 2x SSC geschwenkt, zwischen zwei Lagen Whatman 3MM Papier luftgetrocknet und anschließend 2 Stunden bei 80 °C gebacken.

4.6.7.1 Hybridisierung von Northern Blots

Hefe-RNA : 1g in 100ml H₂O lösen, bei 4°C lagern; zum Gebrauch wird die Hefe-RNA 10 Minuten auf 100°C erhitzt und sofort in der Prähybridisierungslösung verdünnt (Endkonzentration 0,5mg/ml).

Prähybridisierungslösung : 10% Dextransulfat (2 ml 50% Dextransulfat), 1% SDS (0,5 ml 20% SDS), 1 M NaCl, H₂O ad 9 ml; vor Gebrauch 0,5 ml denaturierte Carrier-DNA sowie 0,5 ml denaturierte Hefe-RNA zufügen.

Hybridisierungslösung : ist die Prähybridisierungslösung, jedoch mit radioaktiv markierter Probe (ein Erneuern der Hybridisierungslösung ist unnötig); Probe vorher 10 Minuten auf 100°C erhitzen und dann sofort in der Hybridisierungslösung verdünnen

Prähybridisierung

Die Prähybridisierung erfolgt analog zu der für DNA Blots, wird jedoch bei 60°C durchgeführt und sollte mindestens 20 Minuten dauern.

Hybridisierung

Die Hybridisierung erfolgt bei 60°C über mindestens 8 Stunden.

Waschen

Nach dem Entfernen der Hybridisierungslösung wird die Nylonfolie zunächst innerhalb des Röhrchens kurz mit 2x SSC gewaschen und dann aus dem Röhrchen in eine Instrumentenschale überführt. Anschließend wird die Membran für 5 Minuten in 2x SSC und dann mindestens zweimal für 15 Minuten mit einer auf 60°C vorgewärmten Lösung von 2x SSC/1% SDS gewaschen. Die Zahl der Waschschrte hängt von der mittels eines Handmonitors gemessenen Aktivität ab. Zum Abschluß erfolgt ein 5minütiger Waschschrte mit 0,1x SSC. Der Blot wird nun in Klarsichtfolie eingeschlagen und exponiert.

4.6.8 Polymerase Chain Reaktion

4.6.8.1 DNA-Amplifikation durch PCR

Die PCR-Reaktion läßt sich in drei Schritte unterteilen:

Denaturierung der Template DNA: Die doppelsträngige Ausgangs-DNA wird bei hohen Temperaturen inkubiert. Die Doppelstränge dissoziieren und bleiben in der Lösung einzelsträngig, bis die Temperatur abgesenkt wird.

Annealing von Primern: Die Extensions-Primer werden so gewählt, daß sie den zu amplifizierenden Bereich der DNA flankieren. Sie sind so beschaffen, daß einer der Primer komplementär zum codierenden Strang diesen bindet, der andere Primer den nicht-codierenden Strang erkennt. Da die Konzentration der Primer in der Lösung sehr hoch ist, wird die Ausbildung von Primer-Template-Komplexen gegenüber der Renaturierung der beiden Einzelstränge bevorzugt werden.

Primer Extension: Der letzte Schritt ist die, von der DNA-Polymerase vermittelte, Verlängerung der Primer in den Primer-Template-Komplexen durch die sogenannte Taq-Polymerase. Die Verwendung von Taq-Polymerase erlaubt die Erhöhung der Temperatur für die Extension Reaktion auf über 70°C. Die hohe Thermostabilität des Enzyms ermöglicht, daß viele Zyklen der PCR ohne Unterbrechung durchlaufen werden können.

10x Reaktionspuffer:	500 mM KCl
	100 mM Tris/HCl (pH 8,3)
	15 mM MgCl ₂
	0,01 % Gelatine
10 x Nukleotidmix:	25 mM dATP, dCTP, dGTP, TTP

Ein Standardansatz wird in der folgenden Reihenfolge zusammenpipettiert:

Wasser:	24,75 µl
10 x Reaktionspuffer:	5 µl

10 x Nukleotidmix:	5 µl (2,5 mM jeden Nukleotids)
Primer 1:	5 µl (50 pM)
Primer 2:	5 µl (50 pM)
Template-DNA:	5 µl (1 ng)
Taq-Polymerase:	0,25 µl (5 U/µl)

Die Proben werden mit Mineralöl überschichtet, um ein Verdunsten der Flüssigkeit und damit die Veränderung der Reaktionsbedingungen zu vermeiden. Anschließend werden sie in den PCR-Prozessor gegeben und die Reaktion gestartet.

Ein Standardtemperaturprofil für die DNA-Amplifikation mit ungeschnittenen Plasmiden als Template sieht wie folgt aus (in Klammern Standardbedingungen für ExpandTM Long Template PCR System):

1 min 94 C (1 min 92°C)

1 min 56 C (1 min 62°C)

3 min 72 C (3 min 68°C)

Die letzten drei Schritte werden 35 mal wiederholt.

Abweichungen von diesem Temperaturprofil, können bei der Verwendung anderer Primer notwendig werden. Zur Analyse der PCR Produkte wird $\frac{1}{10}$ des Reaktionsansatzes auf ein Agarosegel geladen.

4.7 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung mit Sequenase ist eine Variante der Sequenzierung mit T7-DNA Polymerase. Die Sequenase ist aus der T7-DNA Polymerase durch Deletion der 3'→5' Exonukleaseaktivität hervorgegangen. Die Sequenziermethode ist eine Abwandlung der Methode nach Sanger. Alle notwendigen Reagenzien sind in einem Kit von USB enthalten. Die Sequenzierreaktion läßt sich in fünf Schritte unterteilen:

Denaturierung der Template DNA: Die DNA wird unter basischen Bedingungen denaturiert und anschließend gefällt. Die DNA liegt schließlich als Einzelstrang vor.

Zur Sequenzierung werden 2 µg DNA mit 2 µl Denaturierungspuffer 5 min bei Raumtemperatur denaturiert, mit 3 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,5) neutralisiert, mit 75 µl Ethanol

gefällt und 2 x mit 70 % Ethanol gewaschen. Direkt vor Reaktionsstart wird die DNA in 7 µl Wasser aufgenommen.

Denaturierungspuffer: 2 M NaOH
 2 mM EDTA

Annealing von Primern: Die Primer werden so gewählt, daß sie homolog zu dem Bereich sind, der 5' vor der zu lesenden Sequenz liegt. Bei der Sequenzierung kann ein Bereich bis zu etwa 300 bp vom Primer entfernt gelesen werden. Zur Bindung zwischen Template-DNA und Primer wird die Temperatur langsam von der Schmelztemperatur auf 37°C gesenkt.

Zum Annealing wird folgender Ansatz pipettiert:

7 µl denaturierte DNA
2 µl Sequenase-Puffer
1 µl Primer (5 pmol/µl)

Der Ansatz wird 2 min auf 65°C erhitzt und dann langsam auf 37°C abgekühlt.

Primerverlängerung und DNA-Markierung: Die Primerverlängerung entsprechend der Sequenz des Templates und der Einbau von [³⁵S]dATP wird durch die Sequenase-Reaktion durchgeführt. Die anderen drei notwendigen Nukleotide liegen unmarkiert vor.

[³⁵S]dATP: 600 mCi/mmol
Label-Mix: 1,5 µM dGTP
 1,5 µM dCTP
 1,5 µM dTTP

Die Sequenase wird auf 1/8 verdünnt eingesetzt. Zur Verdünnung dient ein spezieller Enzym-Verdünnungspuffer (10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM DTT, 0,5 mg/ml BSA).

Die Labeling-Reaktion wird folgendermaßen pipettiert:

10 µl denaturierte DNA
1 µl 100 mM DTT
2 µl Label-Mix

0,5 µl [³⁵S] dATP

2 µl verdünnte Sequenase

Die Inkubation erfolgt 5 min bei Raumtemperatur.

Termination durch Didesoxy-Nukleotide: Die Termination der Primerverlängerung erfolgt durch die Zugabe von Didesoxynukleotiden, bei denen die 3'-OH Gruppe der Ribose des Nukleotids durch ein H ausgetauscht ist. Da die Verlängerung der Nukleinsäure über die 5'- und 3'-OH der Ribosen der Nukleotide verläuft, kann an einem Didesoxynukleotid kein weiteres Nukleotid ansynthetisiert werden. Durch Zugabe von ddGTP, ddATP, ddTTP oder ddCTP kann die Nukleinsäuresynthese spezifisch nach einem C, T, A oder G in der Template-DNA abgebrochen werden. Da nicht ausschließlich nur die Didesoxynukleotide angeboten werden, sondern auch die Desoxynukleotide, finden die Syntheseabbrüche statistisch hinter jedem Vorkommen des entsprechenden Nukleotids des Templates statt.

ddG-Terminations-Mix: 80 µM dGTP, dATP, dCTP, dTTP

8 µM ddGTP

50 mM NaCl

ddA-Termination-Mix: 80 µM dGTP, dATP, dCTP, dTTP

8 µM ddATP

50 mM NaCl

ddT-Terminations-Mix: 80 µM dGTP, dATP, dCTP, dTTP

8 µM ddTTP

50 mM NaCl

ddC-Terminations-Mix: 80 µM dGTP, dATP, dCTP, dTTP

8 µM ddCTP

50 mM NaCl

Für die Termination werden jeweils 3,5 µl aus dem Labelingansatz auf 2,5 µl auf 37°C vorgewärmten Terminationsmix ddG, ddA, ddT und ddC gegeben und 5 min bei 37°C inkubiert.

Reaktionsstop: Die Reaktion wird durch Zugabe von 4 µl Stop-Puffer beendet. Für den Auftrag auf das Sequenziergel (5.8.2.5.) reichen 2-4 µl pro Bahn aus.

Stop-Puffer:	95 % Formamid
	20 mM EDTA
	0,05 % Bromphenolblau
	0,05 % Xylencyanol

4.8 Gelelektrophoresen

4.8.1 Agarose Gelelektrophorese

(nach Maniatis et al., 1982)

Laufpuffer (TAE):	40 mM Tris/Acetat (pH 7,5)
	20 mM NaOAc
	1 mM EDTA
5 x Stop-Puffer:	15 % Ficoll
	50 mM EDTA
	5 x TAE
	0,05 % Bromphenolblau
	0,05 % Xylencyanol
Färbelösung:	5 mg/ml Ethidiumbromid in H ₂ O

Die Agarose wird in Laufpuffer aufgenommen und in einem Mikrowellenherd gekocht. Zur Anfertigung eines Gels werden in eine Gelkammer 100 ml Agarose-Lösung + 10 µl Färbelösung ausgegossen. Um die Geltaschen zu formen, wird der Kamm eingesetzt. Nach dem Erstarren wird das Gel in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt. Die Proben werden vor dem Auftragen mit $\frac{1}{4}$ Volumen des 5 x Stop-Puffers versetzt, 10 Minuten auf 65°C erhitzt und aufgetragen. Für die Erkennung der Größe eines Fragmentes werden Standards parallel mit aufgetragen. Die Elektrophorese wird bei ungefähr 100 V und 30 mA durchgeführt. Je nach Größe der Fragmente werden die DNA-Banden nach 1-3-stündiger Elektrophorese (Minigel entsprechend kürzer) fotografiert. Für die präparative Gewinnung der DNA-Fragmente werden die Banden unter UV-Licht (302 nm) aus dem Agarosegel ausgeschnitten.

4.8.2 Polyacrylamid Gelelektrophoresen (PAGE)

(nach Maniatis et al., 1982)

4.8.2.1 Tricin-SDS Polyacrylamidgele

(nach Schagger & von Jagow, 1987)

Kathodenpuffer:	20 mM Tris/HCl (pH 8,25)
	20 mM Tricine
	0,02 % SDS
Anodenpuffer:	40 mM Tris/HCl (pH 8,9)
Gelpuffer:	3 M Tris/HCl (pH 8,45)
	0,3 % SDS

Ein 10 %iges Trenngel wird folgendermaßen angesetzt:

Acrylamid/Bis-Acrylamid (49,5/1,5)	6,1 ml
Glycerin:	4 ml
Gelpuffer:	10 ml
Wasser:	10 ml

Nach dem Mischen werden zur Polymerisierung 15 µl TEMED und 150 µl 10 %iges APS zugesetzt. Die Lösung wird zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisierung wird das Isopropanol entfernt und das Sammelgel in den verbleibenden Raum gegossen.

Ansatz des Sammelgels:

Acrylamid/Bis-Acrylamid (49,5/1,5)	1 ml
Gelpuffer:	3,1 ml
Wasser:	8,4 ml

Zur Polymerisierung werden 10 µl TEMED und 100 µl 10 %iges APS zugegeben. Das Gel wird nach dem Auspolymerisieren in die Elektrophoresekammer eingesetzt und der Anoden- beziehungsweise Kathodenpuffer eingefüllt. Die Proben werden, wie bei der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese, 15 Minuten im Auftragspuffer bei 65°C inkubiert und

auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese läuft über Nacht bei 60 V oder bei 200 V für 6 - 8 Stunden. Nach der Elektrophorese wird das Gel 15 Minuten schaukelnd in Fixierlösung fixiert und zur Autoradiographie getrocknet.

Auftragspuffer:	50 mM Tris/HCl (pH 6,8)
	4 % SDS
	12 % Glycerol
	2 % β -Mercaptoethanol
	0,01 % Serva-Blue
Fixierlösung für Gele:	50 % Methanol
	10 % Essigsäure

4.8.2.2 Herstellung von Sequenziergelen

(nach Maniatis et al., 1982)

Laufpuffer (TBE):	100 mM Tris/Borat (pH 8,3)
	2,5 mM EDTA

Ein 6 %iges Sequenziergel wird folgendermaßen angesetzt:

Harnstoff:	50 g
10 x TBE:	10 ml
Acrylamid/Bis-Acrylamid (40/2):	15 ml
Wasser:	38 ml

bei 50°C lösen und auf 100 ml mit Wasser auffüllen. Die Lösung wird filtriert, mit 40 μ l TEMED und 400 μ l 10%igem APS zur Polymerisierung gebracht und sofort das Gel gegossen. Nach mindestens einer Stunde Polymerisierung sollte das Gel bei 60 W mindestens 30 Minuten vorlaufen. Der eigentliche Lauf wird ebenfalls bei 60 W durchgeführt. Nach dem Lauf wird das Gel auf Whatman 3MM Papier überführt und für eine Stunde bei 80°C auf einem Gelrockner getrocknet. In der Regel reicht eine Exposition des Röntgenfilms über Nacht bei -70°C aus, um die Banden sichtbar werden zu lassen.

4.9 Arbeiten mit eukaryontischen Zellkulturen

4.9.1 Kulturmedien und Lösungen

Alle Reagenzien werden in "Millipore"-Wasser gelöst und sterilfiltriert (Porengröße 2 µm).

Pen/Strep (100x):	1,212 g Ampicillin/200ml (10.000 U/ml) 2 g Streptomycin/200 ml (10 mg/ml) zum lösen mit NaOH auf pH 7,0 einstellen, bei –20°C lagern
PBS:	140 mM NaCl 27 mM KCl 7,2 mM Na ₂ HPO ₄ 14,7 mM KH ₂ PO ₄ (pH 6,8 - 7,0)
TEP:	96 ml steriles PBS 120 µl 0,5 M EDTA (Endkonz.: 6 mM) 4 ml Trypsin (0,1 - 0,2%; je nach Aktivität)
Puromycin:	5 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert, bei –20°C lagern
G418:	100 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert, bei –20°C lagern
Histidinol:	1 M in H ₂ O, sterilfiltriert, bei 4°C lagern
Tetrazyklin:	2 mg/ml in 50% Ethanol, bei –20°C lagern
Doxyzyklin:	2 mg/ml in 50% Ethanol, bei –20°C lagern
HEBS (2x):	280 mM NaCl 50 mM HEPES 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 7,1)

DME-Medium:

Man füllt Millipore-Wasser in 10 l Steilbrustflaschen, gibt die erforderliche Menge Pulvermedium (DME-Pulver von Flow) dazu und rührt mit einem Rührkern, bis das Medium vollständig aufgelöst ist. Nach Zugabe von $\frac{1}{100}$ Volumen 1 M HEPES und 3,75 g/l NaHCO₃ wird das Medium in sterile Flaschen filtriert. Die Flaschen werden zwei Tage bei Raumtemperatur inkubiert, um eventuelle Kontaminationen zu erkennen, und anschließend bei 4°C gelagert. Die Fertigstellung erfolgt bei Bedarf. $\frac{1}{10}$ Volumen Serum, $\frac{1}{100}$ Volumen Glutaminlösung (29,23 g/l) und $\frac{1}{100}$ Volumen Pen/Strep (Antibiotika) werden erst kurz vor Gebrauch zugesetzt.

4.9.2 Zelllinien und Viren

- C243: Maus-Fibroblasten-Zelllinie (Oie et al., 1977). Die Zelllinie wurde durch MLV transformiert und wächst obligat mit Mycoplasmen. Erhalten von R. Zawatzky, DKFZ, Heidelberg.
- LMTK⁻: Stabile Maus-Fibroblasten-Zelllinie; Derivat der L929 Zelllinie mit defektem Thymidinkinasegen und BudR-Resistenz (ATCC CCL 1.3)
- NIH3T3: Embryonale Mausfibroblasten (ATCC CRL 1658)
- NIH3T3TA: NIH3T3-Zelllinie, die stabil den Tetrazyklin-reprimierbaren Transaktivator exprimiert (Kröger, 1997).
- 293: ATCC CRL 1573 (Mit humanem Adenovirus Typ 5 DNA transformierte primäre embryonale Zelllinie.)
- VSV: Vesicular Stomatitis Virus

4.9.3 Kultivierung von Zelllinien

Grundsätzlich gilt, daß bei der Kultivierung von Zellen aufgrund des langsamen Wachstums auf extrem sterile Arbeitsbedingungen zu achten ist. So dürfen zuvor sterilisierte Geräte und Lösungen nur unter der sterilen Werkbank geöffnet werden.

Die Zellen werden bei 37°C und 5% CO₂ in einem naß-begasten Brutschrank kultiviert. Für die verwendeten Zelltypen wird DME-Medium mit 10% FCS, 20 mM Glutamin, 60 µg/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin verwendet. Die Zellen werden, wenn sie konfluent sind, umgesetzt (passagiert).

4.9.3.1 Passagieren

Aus dem Kulturgefäß wird das Medium abgesogen und die adhärenenten Zellen mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wird der Zellrasen mit einer minimalen Menge an TEP-Puffer bedeckt und die Zellen nach ungefähr einer Minute durch einen Handschlag von der Wachstumsunterlage abgelöst. Die Trypsinaktivität wird durch die sofortige Zugabe von dem 4fachen Volumen an serumhaltigen DME-Medium gestoppt (das verwendete Serum enthält Trypsininhibitoren). C243-Zellen werden ohne Trypsin-Behandlung durch mehrmaliges Abschlagen abgelöst. Ein Aliquot wird in ein neues Kulturgefäß überführt.

4.9.3.2 Langzeitlagerung

Logarithmisch wachsende Zellen einer kleinen Flasche (ca. 3×10^6 Zellen) werden mit PBS gewaschen und mit 1 ml TEP abgelöst. Man nimmt die Zellsuspension in 4 ml Medium auf und zentrifugiert 5 Minuten bei 1000 UpM (Hettich Rotanta). Der Überstand wird abgesaugt, die Zellen werden in 2 ml kaltem FCS mit 5% DMSO aufgenommen und auf 3-4 Einfrierröhrchen (Bio-Freeze-Vials, Fa. Costar) aliquotiert und sofort auf Eis gestellt.

Man beläßt die Röhrchen maximal 60 Minuten auf Eis, verpackt sie in Zellstoff und lagert sie in Styroporkästen bei -70°C . Nach ca. 12 Stunden können sie in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Das Auftauen der Zellen sollte möglichst schnell erfolgen. Dazu erwärmt man die Röhrchen im 37°C -Wasserbad und nimmt die Zellsuspension in 10 ml Medium auf, um das DMSO zu verdünnen. Die Zellsuspension wird 5 Minuten bei 1000 UpM zentrifugiert, das Zellpellet in 5 ml frischem Medium aufgenommen und in eine kleine Flasche überführt.

4.9.4 Gentransfer in Säugerzellen

4.9.4.1 Transfektion mittels Kopräzipitation

2x HEBS-Lösung : 280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na_2HPO_4 , pH 7,1; aliquotieren; bei -20°C lagern.

4 Stunden vor Zugabe der Präzipitate erfolgt ein Medienwechsel.

Die Präzipitate werden wie folgt hergestellt :

In einem ersten Röhrchen werden 100 μl 2x konzentrierten HEBS-Puffers vorgelegt (Gesamtvolumen je Präzipitat bei 9,1 cm^2 -Gefäßen beträgt 200 μl). In ein zweites Röhrchen pipettiert man 10 μl 2,5 M CaCl_2 , sowie die DNA, füllt bis zum Endvolumen von 100 μl mit Wasser auf und tropft das CaCl_2 -DNA-Gemisch unter Aufwirbeln des HEBS (Vortexen) in den Transfektionspuffer. Nach 5 - 15 Minuten bei Raumtemperatur hat sich das Präzipitat gebildet und wird auf die Zellen gegeben. Überschüssiges Präzipitat wird nach mindestens vier Stunden, spätestens nach einer Nacht von den Zellen entfernt (Medienwechsel).

Für eine Zelldichte von 5×10^5 Zellen pro 55 cm^2 Platten muß die DNA-Menge und das Präzipitationsvolumen erhöht werden. In diesem Fall beträgt das Volumen 1 ml.

Plasmid-Transfer

Plasmide, die einen eukaryontischen Selektionsmarker tragen können mit 1 µg DNA pro 9,1 cm² Kulturfläche transfiziert werden

Kotransfer

Hierbei werden pro 9,1 cm²-Kulturfläche neben 1 µg eines Expressionsplasmids 0,1 µg eines Selektionsplasmids der CaCl₂ Lösung zugesetzt und copräzipitiert.

Transiente Expression

Die Herstellung der Präzipitate verläuft wie bei der stabilen Transfektion. Bei dieser Methode wird die Expressionsbestimmung an der extrachromosomalen Fremd-DNA durchgeführt. Am ersten Tag nach der Transfektion werden die Präzipitate durch Mediumwechsel aus dem Zellüberstand entfernt. Am zweiten Tag werden die Zellen auf die Expression des transfizierten Gens untersucht. Da die Transfektionseffizienz der Zellen bei dieser Art von Transfektion stark schwankt, wird ein Referenzplasmid mit konstanter Menge kotransfiziert. Die Expression des Referenzplasmids ist ein Maß für die Transfektionseffizienz.

4.9.4.2 Durchführung einer Selektion

In der Regel wird das Medium einen Tag nach der Transfektion gewechselt. Am nächsten Tag werden die Zellen mindestens eins zu drei umgesetzt und mit Selektionsmedium versetzt, das alle 2-3 Tage erneuert wird. Klone erscheinen je nach Selektion und Zelltyp 8-21 Tage später. Die Klone werden, wenn sie Stecknadelkopfgröße erreicht haben, auf der Flaschenrückseite mit Hilfe eines Filzstifts markiert, gezählt und die Zählung unter dem Mikroskop kontrolliert. Anschließend können schnell wachsende Zelltypen isoliert, als Mischung weiter verwendet oder subkloniert werden. In Einzelfällen empfiehlt sich die Verwendung konditioniertem Mediums.

Die zur Selektion verwendeten Drogenkonzentrationen sind vom Zelltyp abhängig und müssen vorher getestet werden.

4.9.5 IFN-Induktion von Zellen

Die Interferon-Induktion von murinen Zelllinien wurde standardmäßig mit 250 U/ml IFN- γ (Boehringer) für 4 h und 500 U/ml IFN- β (rekombinantes IFN- β , das durch transfizierte BHK-Zellen sekretiert wird) für 24 h durchgeführt.

4.10 Proteinanalytik

4.10.1 Westernblot

Proteine werden in einem Gelsystem aufgetrennt und anschließend im elektrischen Feld auf eine Nylon- oder Nitrocellulose-Membran transferiert. Nach Absättigung aller freien Bindungsstellen durch Fremdproteine (z.B. BSA oder FCS) erfolgt der Nachweis eines bestimmten Proteins über die spezifische Interaktion mit einem Antikörper.

Blotpuffer:	25 mM Tris/HCl
	192 mM Glycin
	15% (v/v) Methanol
TBS-T:	20 mM Tris/HCl, pH 7,5
	137 mM NaCl
	0,1% Tween-20

Nach der Elektrophorese wird das Gel 15 min in Blotpuffer geschwenkt. Eine Hybond ECL-Membran (Amersham) und 4 Whatman-3MM-Filterpapiere in der Größe eines Gels werden in Wasser angefeuchtet und 10 min in Blotpuffer äquilibriert. In der Semidry-Elektroblot-Apparatur wird das Gel luftblasenfrei auf die Membran gelegt und mit zwei Lagen Whatman-Papier bedeckt. Der Transfer der Proteine erfolgt eine Stunde bei 17 V. Für den immunologischen Nachweis von gebundenen Proteinen wird die Membran mit 10% FCS oder 3% BSA in TBS-T 1 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C abgesättigt. Die Inkubation mit dem primären, Protein-spezifischen Antikörper erfolgt für 1-2 h bei Raumtemperatur. Nach 4-maligem 15 minütigem Waschen mit TBS-T mit 10% FCS wird mit dem sekundären, Antikörper-spezifischen Antikörper (z.B. Ziege anti-Maus-IgG gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, Dianova) für 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem 4-maligem Waschen werden die Antigen-Antikörper-Komplexe auf der Membran mit Hilfe der "Enhanced Chemilumineszenz" (ECL, Amersham, für Peroxidase) nachge-

wiesen. Dazu wird je 1 Vol der beiden ECL-Lösungen miteinander vermischt und die Membran 1 min darin inkubiert. Dabei entstehen durch die Oxidation von Luminol Lichtblitze, die durch Exposition eines Films (Hyperfilm ECL, Amersham) sichtbar gemacht werden können.

4.10.2 Herstellung von Zellextrakten für Reporter-Gen-Assays

Zellen einer 6 Lochplatte werden mit PBS gewaschen und in PBS oder TEN-Puffer abgelöst. Sie werden durch Zentrifugieren (10 min, 1200 UpM) pelletiert und in 100-150 µl 250 mM Tris/HCl pH 7,5 resuspendiert. Durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und schnellem Auftauen bei 37°C werden die Zellen aufgeschlossen. Die Zelltrümmer werden abzentrifugiert (10 min, 13000 UpM).

TEN-Puffer: 40 mM Tris/HCl, pH 7,5
 1 mM EDTA
 150 mM NaCl

4.10.3 Proteinbestimmung (Mikroassay)

Die Proteinbestimmung nach Bradford basiert auf der Bildung von Farbstoff-Protein-Komplexen. Der Farbstoff Coomassie Brilliantblau G250 reagiert mit Proteinen, die dann bei 595 nm ein charakteristisches Absorptionsmaximum aufweisen, während der ungebundene Farbstoff ein Absorptionsmaximum bei 465 nm zeigt.

In einer Mikrotiterplatte für optische Tests werden in die Löcher der ersten Reihe 190 µl, in die anderen Reihen jeweils 100 µl H₂O vorgelegt. 10 µl der Eichproteinlösung (1 mg/ml Lysozym) bzw. der zu messenden Proben werden in die Löcher der ersten Reihe dazu pipettiert. Mit einer Multikanalpipette wird gut durchgemischt, 100 µl entnommen und in die zweite Reihe gegeben. So fährt man fort und erhält jeweils eine 1:2-Verdünnung. Nach Zugabe von 100 µl Bradfordlösung in jedes Loch können die Proben nach 2 min im ELISA-Reader bei 595 nm gemessen werden. Aus den gemessenen Eichwerten läßt sich eine Eichgerade erstellen, mit deren Hilfe der Proteingehalt der Proben direkt ermittelt werden kann.

4.10.4 Bestimmung der Luciferaseaktivität

Reaktionspuffer : 25 mM Glycylglycin, pH 7,8, 5 mM ATP, 15 mM MgSO₄
Luziferinlösung: 0,2 mM Luziferin (D-Luciferin, synthetisch) in 25 mM
 Glycylglycin, pH 7,8

Von Zellextrakten werden 10 µl zu 350 µl Reaktionspuffer, der in Meßröhrchen vorgelegt wird, gegeben und sofort im Luminometer unter automatischer Zugabe von 50 µl Luziferinlösung vermessen (Meßdauer 10 s). Aus dem Vergleich der Meßwerte verschiedener Proben lassen sich Luziferaseaktivitätsverhältnisse ableiten. Benötigt man absolute Werte, so muß eine Eichreihe erstellt werden (Type III, Firefly Photinus Pyralis, Sigma L-9009).

4.10.5 CAT-ELISA

Die Genaktivität des Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gens (CAT) wurde nicht über die enzymatische Aktivität, sondern über die Menge vorhandenen CAT-Proteins bestimmt. Es wurde das CAT-ELISA-Kit von Boehringer-Mannheim benutzt. Dies ist ein “double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay”, bei dem anti-CAT-Antikörper adsorbtiv an die Wände der Mikrotiterplatten (MTP)-Module gebunden sind. Zwischen 10 und 60 µl der zu untersuchenden Zellextrakte werden in die Löcher der MTP-Module pipettiert und auf 200 µl mit Probenpuffer aufgefüllt. Die MTP-Module werden gegen Verdunstung mit Folie abgedeckt und 1 h bei 37°C inkubiert. Das CAT-Protein bindet hierbei spezifisch an die beschichteten Module. Durch Ausschütteln und Ausklopfen wird die Lösung entfernt und 4 mal mit je 250 µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend werden je 200 µl anti-CAT-DIG (2 µg/ml) in die Löcher pipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert. In diesem Schritt wird das fixierte CAT-Enzym durch den anti-CAT-Antikörper, der mit Digoxigenin markiert ist, gebunden. Der Waschzyklus wird wiederholt, je 200 µl anti-DIG-POD (150 mU/ml) in die Löcher gegeben und 1h bei 37°C inkubiert. Hierbei wird anti-CAT-DIG durch einen Peroxidase-markierten Antikörper gegen Digoxigenin detektiert und in der nachfolgenden Substratreaktion quantitativ nachgewiesen. Hierzu werden die Module wieder gewaschen und 200 µl POD-Substrat in die Löcher gegeben. Die Extinktion wird photometrisch nach 10-60 min im ELISA-Reader bei 405 nm (Referenz 490 nm) bestimmt. Die resultierende Extinktion ist direkt proportional der eingesetzten Konzentration an CAT-Protein.

4.10.6 Bestimmung der SEAP-Aktivität

4.10.6.1 Spektrometrische Bestimmung

Sekretierte alkalische Phosphatase (SEAP) katalysiert die Hydrolyse von gebundenem Phosphat. Bei der Hydrolyse von para-Nitrophenylphosphat (PNP) kommt es zu einer Änderung der Absorption bei 405 nm.

2 x SEAP-Puffer: 2 M D-Ethanolamin, pH 9.8
 1 mM MgCl₂
 20 mM L-Homoarginin

Para-Nitrophenylphosphat (PNP): 120 mM in 1x SEAP-Puffer

Der serumfreie Überstand der Zellen wird 5 min bei 65°C erhitzt und anschließend zur Entfernung von Zelltrümmern 1 min zentrifugiert. 100 µl des Überstandes werden in 100 µl 2 x SEAP-Puffer aufgenommen und 10 min bei 37°C auf einer Mikrotiterplatte inkubiert. Anschließend werden 20 µl PNP-Lösung hinzu gegeben und gut gemischt. Die Änderung der Absorption bei 405 nm wird in verschiedenen Zeitintervallen gemessen. Die Absorption wird gegen die Zeit aufgetragen, aus der Steigung kann die sekretierte SEAP-Menge bestimmt werden.

4.10.6.2 „Phospha-Light-Assay“ von TROPIX

Vom Überstand der Zellen werden 33 µl mit 100 µl 1xDiluent-Puffer gemischt und der Ansatz 30 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend werden die Proben auf Eis bis Raumtemperatur runter gekühlt. 100 µl des Reaktionsansatzes werden mit 100 µl Assay-Puffer gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 100 µl Reaktions-Puffer zugegeben und nach 20 Minuten die Lumineszenz gemessen.

4.10.7 Bestimmung von Interferon

Zellfärbelösung: 8,5 g NaCl
 5 g Kristallviolett
 500 ml Ethanol
 143 ml Formaldehyd (35 %)
 ad 1000 ml H₂O

Interferon verleiht Säuger-Zellen homologer Spezies antiviralen Schutz. Die Bestimmung von murinem IFN- β erfolgt in LMTK⁻-Zellen (Maus). LMTK⁻-Zellen werden auf Mikrotiterplatten (0,28 cm²/Napf) in DME-Medium in einer Konzentration ausgesät, daß die Platten am nächsten Tag konfluent bewachsen sind (3 x 10⁶ Zellen/96-Loch-Platte). Vor Zugabe der Zell-Überstände wird das alte Medium abgeschlagen und pro Loch 100 μ l frisches Medium auf die Zellen gegeben. 100 μ l der zu testenden Überstände bzw. 100 μ l Interferonstandard (1000 IE) werden in die Löcher der ersten Reihe dazu pipettiert. Mit einer Multikanalpipette wird gut durchmischt, 100 μ l entnommen und in die zweite Reihe gegeben. So fährt man fort und erhält jeweils eine 1:2-Verdünnung. Die Zellen werden für 24 h inkubiert. Anschließend wird das Medium abgeschlagen und je 100 μ l einer Virussuspension (DME mit 5 % FCS und 10⁴ pfu VSV) pro Loch der Mikrotiterplatte auf die Zellen gegeben. 48 h nach der Infektion der LMTK⁻-Zellen kann die Lyse der nicht oder ungenügend geschützten Zellen durch Färben der überlebenden Zellen mit der Zellfärbelösung dargestellt werden. Durch visuellen Vergleich mit dem Interferonstandard kann anhand des antiviralen Schutzes der Zellen der Interferongehalt in den einzelnen Proben ermittelt werden.

4.11 Plasmide

4.11.1 Erhaltene Plasmide

pAG60	Colbere et al., 1981
pBHECAT	Artelt et al., 1989
pBI-4	Baron et al., 1995
pDAF2AHIS	D. Spitzer, 1998
pHISG54-CAT	Blyssen et al., 1995
pHT	F. Kuhnert, 1995
pIRF-Promotor	Sims et al., 1993
pISRE II	W. Bruns, Wuppertal
pMT7-IRFhER	S. Kirchhoff, 1993
pPromTrap-TkSEAP	S. Kirchhoff, 1995
pRBTTA	J. Unsinger, 1998
pSBC1/2	Dirks et al., 1993
pSBC1-SEAP	Dirks et al., 1993
pSBC1-Stat1GFP	Köster & Hauser, 1998
ptacrasG12V	M Ahmadin, MPI Dortmund
pTBC1	Kirchhoff et al., 1995
pTBC-HER2/SEAP	Baasner et al., 1996
pTKSEAP	Kirchhoff et al., 1996

4.11.2 Hergestellte Plasmide

pVBC2: Hilfsvektor für die Klonierung polycistronischer Expressionsvektoren. 5' von der MCS wurde mit Hilfe der Oligos P24 und P25 eine NotI- und eine EagI-Schnittstelle eingefügt.

pVBC2SEAP: Klonierungs- und Expressionsvektor für SEAP unter der Kontrolle des SV40 Promotors. Das SEAP-Gen aus pSBC2-SEAP wurde über EcoRI/HindIII in pVBC2 kloniert

pVBC2R: Klonierungs- und Expressionsvektor für das c-Ha-ras Gen unter der Kontrolle des SV40 Promotors. Das c-Ha-ras-Gen aus ptacrasG12V wurde über HindII/PstI in pVBC2 kloniert.

pVBC3: Klonierungs- und Expressionsvektor für polycistronische Expressionsvektoren unter der Kontrolle des SV40 Promotors.

pVBC3R: Zwischenkonstrukt für eine multicistronische Expression von c-Ha-ras unter der Kontrolle des SV40 Promotors. Das c-Ha-ras-Gen aus ptacrasG12V wurde über HindII/PstI in pVBC3 kloniert.

pVBC3RS: Bicistronisches Expressionskonstrukt für c-Ha-ras und SEAP unter der Kontrolle des SV40 Promotors. Das SEAP Gen aus pVBC2SEAP wurde über NotI in pVBC3R kloniert.

pVBC3M: Zwischenkonstrukt für eine multicistronische Expression von c-myc unter der Kontrolle des SV40 Promotors. Das c-myc PCR-Fragment aus pSP2 (Oligos P155/P156) wurde in den EcoRI/HindIII geöffneten pVBC3 kloniert.

pVBC3MS: Bicistronischer Expressionsvektor für c-myc und SEAP unter der Kontrolle des SV40 Promotors. Das SEAP Gen aus pVBC2SEAP wurde über NotI in pVBC3M inseriert.

pVBC3MR: Zwischenkonstrukt für eine multicistronische Expression von c-myc und c-Ha-ras unter der Kontrolle des SV40 Promotors. Das c-Ha-ras Gen wurde mit EagI aus pVBC2R geschnitten und in den NotI linearisierten pVBC3M inseriert.

pVBC3MRS: Tricistronischer Expressionsvektor für c-myc, c-Ha-ras und SEAP unter der Kontrolle des SV40 Promotors. Das SEAP Gen wurde über NotI aus pVBC2SEAP geschnitten und in pVBCMR inseriert.

pBTVBC3: Klonierungsvektor für eukaryontische polycistronische Klonierungsvektoren mit bidirektionalem Tetrazyklin-abhängigen Promotor.

pBTSEAP: Expressionsvektor für SEAP-Expression unter der Kontrolle des bidirektionalen Tetrazyklin- abhängigen Promotors. Das SEAP Gen aus pSBC2SEAP wurde über EcoRI/HindII in pBTVBC3 inseriert.

pBTR: Klonierungsvektor für polycistronische Expression von c-Ha-ras unter der Kontrolle des bidirektionalen Tetrazyklin- abhängigen Promotors. c-Ha-ras aus ptacrasG12V wurde über EcoRI/PstI in pBTVBC3 inseriert.

pBTRS: Bicistronischer Expressionsvektor von c-Ha-ras und SEAP unter der Kontrolle des bidirektionalen Tetrazyklin- abhängigen Promotors. Das SEAP Gen wurde über NotI aus pVBC2SEAP geschnitten und in pVBCR inseriert.

pBTM: Zwischenkonstrukt für eine multicistronische Expression von c-myc unter der Kontrolle des bidirektionalen Tetrazyklin- abhängigen Promotors. Das c-myc PCR-Fragment aus pSP2 (Oligos P155/P156) wurde in den EcoRI/HindIII geöffneten pBTVBC3 kloniert pBTMS.

pBTMR: Zwischenkonstrukt für eine multicistronische Expression von c-myc und c-Ha-ras unter der Kontrolle des bidirektionalen Tetrazyklin- abhängigen Promotors. Das c-Ha-ras Gen wurde mit EagI aus pVBC2R geschnitten und in den NotI linearisierten pVBC3M inseriert.

pBTMRS: Tricistronischer Expressionsvektor für c-myc, c-Ha-ras und SEAP unter der Kontrolle des bidirektionalen Tetrazyklin- abhängigen Promotors. Das SEAP Gen wurde über NotI aus pVBC2SEAP geschnitten und in pBTMR inseriert.

pBTIH: Zwischenkonstrukt für eine multicistronische Expression von IRF-1-hER unter der Kontrolle des bidirektionalen Tetrazyklin- abhängigen Promotors. Das IRF-1-hER Gen wurde mit HindIII aus pMT7-IRF1hER geschnitten und in pBTVBC3 inseriert.

pBTIHEG: Bicistronischer Expressionsvektor für IRF-1-hER und eGFP unter der Kontrolle des bidirektionalen Tetrazyklin- abhängigen Promotors. Das eGFP Gen wurde überEcoRI/NotI aus pEGFP-1 in pBTIH kloniert.

pMRSBTIG: Polycistronischer Expressionsvektor für IRF-1-hER, eGFP, c-myc, c-Ha-ras und SEAP unter der Kontrolle des bidirektionalen Tetrazyklin- abhängigen Promotors. Die Gene c-my, c-Ha.ras und SEAP wurden mit PmeI aus pBTMRS geschnitten und in den mit SwaI linearisierten pBTIHEG inseriert.

pBTIHH: Bicistronischer Expressionsvektor für IRF-1-hER und Histidinol unter der Kontrolle des bidirektionalen Tetrazyklin- abhängigen Promotors. Das Histidinol Gen wurde mit NotI aus pDAF2AHis geschnitten und in pBTIH inseriert.

pBTIHH: Tricistronischer Expressionsvektor für tTA, IRF-1-hER und Histidinol unter der Kontrolle des bidirektionalen Tetrazyklin- abhängigen Promotors. Das IRF-1-hER Gen und das Histidinol Gen wurden mit PmeI aus pBTIHH geschnitten und in den mit SwaI linearisierten pRBTTA inseriert.

pBTHT: Expressionsvektor für das Fusionsprotein HykTK unter der Kontrolle des bidirektionalen Tetrazyklin- abhängigen Promotors. Das HykTK Gen wurde BamHI/MfeI aus pHT geschnitten und in pBTVBC3 inseriert.

pHBTMRS: Polycistronischer Expressionsvektor für HykTK, c-myc, c-Ha-ras und SEAP unter der Kontrolle des bidirektionalen Tetrazyklin- abhängigen Promotors. c-myc, c-Ha-ras und SEAP wurden mit PmeI aus pBTMRS geschnitten und in den mit SwaI linearisierten pRBTTA inseriert.

pICE1: IRF-1 induzierbares Reportergenkonstrukt. Die Oligos 7057 und 7056 wurden multimerisiert und in die AsuII-Schnittstelle von pPromTrap-TkSEAP integriert. Weitere nach diesem Schema hergestellte Plasmide sind: pICE6, pICE9, pICE10, pICE11.

piNOS19: IRF-1 induzierbares Reportergenkonstrukt. Die Oligos 7058 und 7059 wurden multimerisiert und in die AsuII-Schnittstelle von pPromTrap-TkSEAP integriert. Weitere nach diesem Schema hergestellte Plasmide sind: piNOS21, piNOS22, piNOS23.

5 Abkürzungen und Zeichen

A	Adenosin
α	alpha
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
β	beta
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalovirus
cpm	Radioaktive Zerfälle pro Minute
Da	Dalton
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat(A,C,T,G)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DME	Dulbecco's modification of Eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dox	Doxzyklin
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	foetales Kälberserum
G	Guanin
γ	gamma
GAF	γ -IFN Activated Factor
GAS	γ -IFN Activated Site
GFP	Green Fluorescent Protein
h	Stunde
Hepes	n-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HSV-TK	Herpes simplex virus Thymidinkinase
Hyg	Hygromycin-B
ICSBP	Interferon Consensus Sequence Binding Protein
IFN	Interferon
IRF	Interferon Regulatory Factor

IRES	Internal Ribosomal Entry Site
ISG	Interferon Stimulated Gene
ISGF	Interferon Stimulates Gene Factor
ISRE	Interferon Stimulated Response Element
JAK	Janus-Kinase
Luc	Luziferase
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
MCS	multiple cloning site
mRNA	messenger-RNA
OASE	2'-5'-Oligoadenylatsynthetase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PKR	Proteinkinase R
PolyA	Polyadenylierungssignal
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SV40	Simian Virus 40
T	Thymin
Tet	Tetrazyklin
Tex	transiente Expression
TNF	Tumor Nekrosis Faktor
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
tRNA	transfer RNA
tTA	Tetrazyklin-regulierbarer Transaktivator
u	units, Einheiten zur Kennzeichnung von Enzymaktivitäten
VSV	Vesicular Stromatitis Virus

Alle nicht aufgeführten Abkürzungen physikalischer Größen und deren Einheiten entsprechen dem SI-System.

6 Literatur

Aaronden S. (1991) *Growth factors and cancer*. Science 254: 1146-1153

Abdollahi A., Lord K. A., Hoffmann-Liebermann B. and Liebermann D. (1991) *Interferon regulatory factor 1 is a myeloid differentiation response gene induced by interleukin 6 and leukemia inhibitory factor: role in growth inhibition*. Cell Growth Diff. 2: 401-407

Adams J.M. and Cory S. (1991) *Transgenic models for haemopoietic malignancies*. Biochim. Biophys. Acte 1072: 9-13

Amati B., Dalton S., Brooks M.W., Littlewood T.D., Evan G.I. and Land H. (1992) *Transcriptional activation by the human c-myc oncoprotein in yeast requires interaction with MAX*. Nature 359: 423-426

Andreù T., Beckers T., Thoenes E., Hilgard P. and von Melchner H. (1998) *Gene trapping identifies inhibitors of oncogenic transformation. The tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3) and collagen type I alpha3 (COL1A2) are epidermal growth factor-regulated growth repressors*. J. Biol. Chem. 273 (22): 13848-1854

Artelt P., Morelle Ch., Ausmeier M., Fitzek M. and Hauser H. (1988) *Vectors for efficient expression in mammalian fibroblastoid, myeloid and lymphoid cells via transfection or infection*. Gene 68: 213-219

Au W.-C., Moore P. A., Lowther W., Juang Y.-T. and Pitha P.M. (1995) *Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes*. Proc Natl. Acad. Sci. USA 92: 11657-11661

Au W.-C., Moore P. A., LaFleur D. W., Tombal B. and Pitha P. M. (1998) *Characterization of the interferon regulatory factor-7 and its potential role in the transcription activation of interferon A genes*. J. Biol. Chem. 44: 29210-29217

Baasner S., von Melchner H., Klenner T., Higard P. and Beckers T. (1996) *Reversible tumorigenesis in mice by conditional expression of the HER/erbB2 rezeptor tyrosine kinase*. Oncogene 13: 901-911

Balmain A., Ramsden M., Bowden G. T. and Smith J. (1984) *Ras gene in chemically induced benign skin papillomas*. Nature 307: 658-660

Barber G. N., Wambach M., Thompson S., Jagus R. and Katze M. G. (1995) *Mutants of the RNA-dependent protein kinase (PKR) lacking double-stranded RNA binding domain I can act as transdominant inhibitors and induce malignant transformation*. Mol. Cell. Biol. 15: 3138-3146

- Baron U., Freundlieb S., Gossen M. and Bujard H.** (1995) *Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter*. Nucleic Acid Res. 23 (17): 3605-3606
- Becker N., Frentzel-Heyne R. und Wagner G.** (1984) *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland*. 2. Aufl., Springer Verlag, Heidelberg
- Benedetti A. and Baglioni C.** (1984) *Inhibition of mRNA binding to ribosomes by localized activation of dsRNA-dependent protein kinase*. Nature (London) 311: 7981
- Berger J., Hauber J., Geiger R. and Cullen B.R.** (1988) *Secreted alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells*. Gene 66: 213-219
- Birnboim H. C. and Doly J.** (1979) *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res. 1: 1513-1523
- Bluyssen H. A. R., Muzaffar R., Vlieststra R. J., der Made A. C. J. van, Leung S., Stark G. R., Kerr I. M., Trapman J. and Levy D. E.** (1995) *Combinatorial association and abundance of components of interferon-stimulated gene factor 3 dictate the selectivity of interferon responses*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 5645-5649
- Bode J. and Hauser H.** (1990) *Biologische Wirkung und Induktionsmechanismen der Interferone*. Carl Hanser Verlag, München: 63-100
- Borman A. M., Le-Mecier P., Girard M. and Kean K. M.** (1997) *Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins*. Nucleic Acids Res. 25 (%): 925-932
- Bos J.L.** (1988) *Ras oncogenes in hematopoietic malignancies*. Hematol. Pathol. 2: 55-63
- Bovolenta C., Driggers P. H., Marks M. S., Medin J. A., Politis A. D., Vogel S. N., Levy D. E., Sagakuchi K., Appella E., Coligan J. E. and Ozato K.** (1994) *Molecular interactions between ICSBP and members of the interferon regulatory factor family*. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5046-5050
- Bryun J., Kim J.-M., Robbind P. D. and Kim S.** (1998) *The selectable marker neo gene down-regulates gene expression from retroviral vectors containing an internal ribosome entry site*. Gene Therapy 5: 1441-1444
- Bullock W. O. et al.** (1987) *Biotechniques* 5: 376-378
- Cha Y. and Deisseroth A. B.** (1994) *Human interferon regulatory factor 2 gene. Intron-exon organization and functional analysis of 5'-flanking region*. J. Biol. Chem. 269: 5279-5287
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W. and Prasher D.C.** (1994) *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science 263: 802-805

- Colbère-Garapin F., Horodniceanu F., Khourilsky P. and Garapin A. C.** (1981) *A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells.* J. Mol. Biol. 150: 1-14
- Darnell Jr. J. E., Kerr I. M. and Stark G. R.** (1994) *Jak-Stat pathway and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signalling proteins.* Science 264: 1415-1421
- de Wet J.R., Wood K.V., DeLuna M., Helinski D.R. and Subramani S.** (1987) *Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells.* Mol. Cell. Biol. 7: 725-737
- Decker T., Lew D. J., Cheng Y.-S. E., Levy D. and Darnell Jr. J. E.** (1989) *Interactions of α - and β -interferon in the transcriptional regulation of the gene encoding a guanylate-binding protein.* EMBO J. 8: 2009-2014
- Deiss L. P., Feinstein E., Berissi H., Cohen O. Kimchi A.** (1995) *Identification of a novel serin/threonin kinase and a novel 15 kD protein as potential mediators of the gamma interferon-induced cell death.* Genes Dev. 9 (1): 15-30
- Der S. D., Yang Y.-L., Weissmann C. and Williams B. R. G.** (1997) *A double-stranded RNA-activated protein kinase-dependent pathway mediating stress-induced apoptosis.* Proc. Natl. Acad. Sci USA 94: 3279-3283
- Dirks W., Wirth M. and Hauser H.** (1993) *Dicistronic transcription units for gene expression in mammalian cells.* Gene 128: 247-249
- Dirks W., Schaper F. and Hauser H.** (1994a) *A new hybrid promoter directs transcription at identical start points in mammalian cells and in vitro.* Gene 149: 389-390
- Dirks W., Schaper F., Kirchhoff S., Morelle C. and Hauser H.** (1994b) *A multifunctional vector family for gene expression in mammalian cells.* Gene 149: 387-388
- Driggers P. H., Ennist D. L., Gleason S. L., Mak W.-H., Marks M. S., Levi B.-Z., Flanagan J. R., Appella E. and Ozato K.** (1990) *An interferon gamma-regulated protein that binds the interferon-inducible enhancer element a major histocompatibility complex class I genes.* Proc Natl. Acad. Sci. USA 87: 3743-3747
- Efrat S., Fusco-De-Mane D., Lemberg H., Emran O. A. and Wang X.** (1995) *Conditional transformation of pancreatic β -cell line derived from transgenic mice expressing a tetracycline-regulated oncogene.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3576-3580
- Eisenbeis C. F., Singh H. and Sorb U.** (1995) *Pip, a novel IRF family member is a lymphoid-specific, PU.1-dependent transcriptional activator.* Genes Dev. 9: 1377-1387
- Emerman M. and Temin H.M.** (1986) *Quantitative analysis of gene suppression in integrated retrovirus vectors.* Mol. Cell. Biol. 6: 792-800

Evan G. I., Wyllie A. H., Gilbert C. S., Littlewood T. D., Land H., Brooks M., Waters C. M., Penn L. Z. and Hancock D. C. (1992) *Induction of Apoptosis in fibroblasts by c-myc protein*. Cell 69: 119-128

Ewald D., Li M., Efrat S., Auer G., Wall R. J., Furth P. A. and Henninghausen L. (1996) *Time-sensitive reversal of hyperplasia in transgenic mice expressing SV40 T antigen*. Science 274: 1384-1386

Faber E. (1980) *The sequential analysis of liver cancer induction*. Biochem. Biophys. Acta 605: 149-166

Fadok V.A., Voelker D.R., Campbell P.A., Cohen J.J., Bratton D.L. and Henson P.M. (1992) *Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages*. J. Immunol. 148: 2207-2216

Fearon E. R., and Vogelstein B. (1990) *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell 61: 757-767

Feil R., Mascrez B., LeMeur M., Metzger D. and Chambon P. (1996) *Ligand-activated site-specific recombination in mice*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 10887-10890

Feng G.-S. and Pawson T. (1994) *Phosphotyrosine phosphatases with SH2 domains: Regulators of signal transduction*. Trends Genet. 10: 54-58

Fialkow P. J. (1976) *Clonal origin of human tumors*. Biochim. Biophys. Acta 458: 283-321

Friedman R. L. and Stark G. R. (1985) *α -Interferon-induced transcription of HLA and metallothionein genes containing homologous upstream sequences*. Nature (London) 314: 637-639

Fu X.-Y., Kessler D. S., Veals S. A., Levy D. A. and Darnell Jr. J. E. (1990) *ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon-alpha consists of multiple interacting polypeptide chains*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8555-8559

Fujita T., Sakakibara J., Sudo Y., Miyamoto M., Kimura Y. and Taniguchi T. (1988) *Evidence for a nuclear factor(s), IRF-1, mediating induction and silencing properties to human IFN-beta gene regulatory elements*. EMBO J. 7 (11): 3397-3405

Fujita T., Kimura Y., Miyamoto M., Barsoumian E. L. and Taniguchi T. (1989) *Induction of endogenous IFN- α and IFN- β genes by a regulatory transcription factor, IRF-1*. Nature (London) 337: 270-272

Galabru J. and Hovanessian A. (1987) *Autophosphorylation of the protein kinase dependent on double-stranded RNA*. J. Biol. Chem. 262: 15538-15544

- Galaktionov K., Chen X. and Beach D.** (1996) *Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc*. Nature 382: 511-517
- Garrick D., Fiering S., Martin D. I. K. and Whitelaw E.** (1998) *Repeat-induced gene silencing in mammals*. Nature genetics 18: 56-59
- Gossen M. and Bujard H.** (1992) *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promotor*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551
- Gossen M. and Bujard H.** (1995) *Efficacy of tetracycline-controlled gene Expression is influenced by cell type: commentary*. Biotechniques 19 (2): 213-217
- Gribaudo G., Lembo D., Cavallo G., Landolfo S. and Lengyel P.** (1991) *Interferon action: Binding of viral RNA to the 40-kilodalton 2'-5'-oligoadenylate synthetase in interferon-treated HeLa cells infected with encephalomyocarditis virus*. J. Virol. 65: 1748-1757
- Groden J., Thliveris A., Samowitz W., Carlson M., Gelbert L. and Albertsen H.** (1991) *Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene*. Cell 66: 589-600
- Groffen J. J. et al.** (1984) *Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosom 22*. Cell: 36: 93-99
- Haines D. S., Strauss K. I. and Gillespie D. H.** (1991) *Cellular response to double-stranded RNA*. J. Cell. Biochem. 46: 9-20
- Hajnal A., Klemenz R. and Schafer R.** (1993) *Up-regulation of lysyl oxidase in spontaneous revertants of H-ras transformed rat fibroblasts*. Cancer Res. 53: 4670-4675
- Hanahan D.** (1983) *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. J. Mol. Biol. 166: 557-580
- Hanahan D.** (1985) *Heritable formation of pancreatic B-cell tumors in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 genes*. Nature 315: 115-122
- Harada H., Fujita T., Miyamoto M., Kimura Y., Maruyama M., Furia A., Miyata T. and Taniguchi T.** (1989) *Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes*. Cell 58: 729-739
- Harada H., Willison K., Sakakibara J., Miyamoto M., Fujita T. and Taniguchi T.** (1990) *Absence of the type I IFN system in EC cells: Transcriptional activator (IRF-1) and repressor (IRF-2) genes are developmentally regulated*. Cell 63: 303-312
- Harada H., Kitagawa M., Tanaka N., Yamamoto H., Harada K., Ishihara M. and Taniguchi T.** (1993) *Anti-oncogenic and oncogenic potentials of interferon regulatory factors-1 and -2*. Science 259: 971-974

- Harada H., Takahashi E.-I., Itoh S., Harada K., Hori T. A. and Taniguchi T.** (1994a) *Structure and regulation of the human interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 genes: implications for a gene network in the interferon system.* Mol. Cell. Biol. 14 (2): 1500-1509
- Harada H., Kondo T., Ogawa S., Tamura T., Kitagawa M., Tanaka N., Lamphier M. S., Hirai H. and Taniguchi T.** (1994b) *Accelerated exon skipping of IRF-1 mRNA in human myelodysplasia/leukemia; A possible mechanism of tumor suppressor inactivation.* Oncogene 9: 3313-3320
- Harrington E. A., Bennett M. R., Fanidi A. and Evans G. I.** (1994) *c-myc induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines.* EMBO J. 13: 3286-3295
- Hassel B.A., Zhou A., Sotomayor C., Maran A. and Silverman R. H.** (1993) *A dominant negative mutant of 2-5A-dependent RNase suppresses antiproliferative and antiviral effects of interferon.* EMBO J. 12 (8): 3297-3304
- He J., Olson J.J., Serbanescu A., Yuang J., Offermann M.K. and James C.D.** (1996) *Transfection of IFN α in human glioblastoma cells and tumorigenicity in association with induction of PKR and OAS gene expression.* J. Neurosurg. 85: 1085-1090
- Henriksson M. and Lüscher B.** (1996) *Proteins of the myc network: essential regulators of the cell growth and differentiation.* Adv. Cancer Res. 68: 109-182
- Hobart M., Ramassar V., Goes N., Urmson J. and Halloran P. F.** (1996) *The induction of class I and II major histocompatibility complex by allogenic stimulation is dependent on the transcription factor interferon regulatory factor 1 (IRF-1): observations in IRF-1 knockout mice.* Transplantation 62 (12): 1895-901
- Horiuchi M., Yamada T., Hayashida W. and Dzau V. J.** (1997) *Interferon regulatory factor-1 up-regulates angiotensin II type 2 receptor and induces apoptosis.* J. Biol. Chem. 272 (18): 11952-11958
- Hovanessian A. G. and Wood J. N.** (1980) *Anticellular and antiviral effects of pppA(2'p5'A)_n.* Virology 101: 81-90
- Hunter T.** (1991) *Cooperation between oncogenes.* Cell 64: 249-270
- Hunter T. and Pines J.** (1991) *Cyclins and cancer.* Cell 66: 249-270
- Hynes N.E.** (1993) *Amplification of the erbB-2 gene in human tumors: its involvement in tumor development, significance as a prognostic factor, and potential as a target for cancer therapy.* Semin. Cancer Biol. 4: 19-26

- Improta T., Schindler C., Horvath C. M., Kerr I. M., Stark G. R. and Darnell J. E. Jr.** (1994) *Transcription factor ISGF-3 formation requires phosphorylated Stat91 protein, but Stat113 protein is phosphorylated independently of Stat91*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 4776-4780
- Isaacs A. and Lindenmann J.** (1957) *The interferon*. Proc. R. Soc. Lond. B. 147: 258-267
- Ish-Horowitz D. and Burk J. F.** (1981) *Rapid and efficient cosmid cloning*. Nucleic Acids Res. 9: 2989-2998
- Itoh S., Harada H., Nakamura Y., White R. and Taniguchi T.** (1991) *Assignment of the human interferon regulatory factor-1 (IRF-1) gene to chromosome 5q23-31*. Genomics 10: 1097-1099
- Jackson R. J., Howell M. T. and Kaminski A.** (1990) *The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation*. Trends Biochem. Sci. 15: 477-483
- Kamijo R., Harada H., Matsuyama T., Bosland M., Gerecitano J., Shapiro D., Le J., Koh S.I., Kimura T., Green S.J., Mak T.W., Taniguchi T. and Vilcek J.** (1994) *Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthetase induction in macrophages*. Science 263: 1612-1615
- Kamp A., Gruis N.a., Weaver-Feldhaus J., Liu Q., Harsham K., Tavitigian S. V., Stockert E., Day R. S., Johnson B. E. and Sholnick M. H.** (1994) *A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types*. Science 263: 1612-1615
- Kato G.J., Lee W.M., Chen L.L. and Dang C.V.** (1992) *Max: functional domains and interaction with c.myc*. Genes Dev. 6: 81-92
- Kawakami T., Matsumoto M., Sato M., Harada H., Taniguchi T. and Kitagawa M.** (1995) *Possible involvement of the transcription factor ISGF3gamma in virus-induced expression of the IFN- β gene*. FEBS Lett. 358: 225-229
- Kerr I. and Brown R. E.** (1978) *pppA₂'p5A₂'p5A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells*. Proc Natl. Acad. Sci. USA 75: 256-260
- Kirchhoff S., Schaper F. and Hauser H.** (1993) *Interferon regulatory factor 1 (IRF-1) mediates cell growth inhibition by transactivating of downstream target genes*. Nucleic Acid Res. 21 (12): 2881-2889
- Kirchhoff S., Koromilas A., Schaper F., Grashoff M., Sonnenberg N. and Hauser H.** (1995) *IRF-1 induced cell growth inhibition and interferon induction requires the activity of the protein kinase PKR*. Oncogene 11: 439-445
- Kirchhoff S., Kröger A., Cruz H., Tümmler M., Schaper F., Köster M. and Hauser H.** (1996) *Regulation of cell growth by IRF-1 in BHK-21 cells*. Cytotechnology 22: 147-156

- Kirchhoff S. and Hauser H.** (1999) *Cooperative activity between HER oncogenes and the tumor suppressor IRF-1 results in apoptosis.* Oncogene in press
- Kistner A., Gossen M., Zimmermann F., Jerecic J., Ullmer C., Lübbert H. and Bujard H.** (1996) *Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 10933-10938
- Koromilas A. E., Roy S., Barber G., Katze M. G. and Sonenberg N.** (1992) *Malignant transformation by a mutant of the IFN-inducible dsRNA-dependent protein kinase.* Science 257: 1685-1689
- Köster M. and Hauser H.** (1999) *Dynamic redistribution of Stat1 protein in IFN signaling visualized by GFP fusion proteins.* European J. Biochem. 260: 137-144
- Kroemer G., Petit P., Zamzami N., Vayssiere J.L. and Mignotte B.** (1995) *The biochemistry of programmed cell death.* FASEB J. 9: 1277-1287
- Kumar A., Commene M., Flickinger T. W., Horvath C. M. and Stark G. R.** *Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STST1-null cells due to low constitutive levels of caspases.* Science 278: 1630-1632
- Lallemand C., Bayat-Sarmadi M., Blanchard B. and Tovey M. G.** (1997) *Identification of a novel transcriptional regulatory element common to the p53 and interferon regulatory I genes.* J. Biol. Chem. 272 (47): 29801-29809
- Lamphier M. and Taniguchi T.** (1994) *The transcription factors IRF-1 and IRF-2- linking the interferon response and cell growth control.* The Immunologist 2 (5): 167-171
- Lee J., Dull T. J., Lax I., Schlessinger J. and Ullrich A.** (1989) *HER2 cytoplasmic domain generates normal mitogenic and transforming signals in a chimeric receptor.* EMBO J. 8 (1): 167-173
- Leone G., DeGregori J., Sears R., Jakoi L. and Nevis J. R.** (1997) *Myc and ras collaborate in inducing accumulation of active cyclinE/Cdk2 and E2F.* Nature 387: 422-426
- Levine A. J.** (1993) *The tumor suppressor genes.* Ann. Rev. Biochem. 62: 623-651
- Levy D. E., Kessler D. S., Pine R. and Darnell J. E.** (1989) *Cytoplasmic activation of ISGF3, the positive regulator of interferon- γ -stimulated transcription, reconstituted in vitro.* Genes Dev. 3: 1362-1371
- Levy D. E., Kessler D. S., Pine R., Reich N. and Darnell J. E.** (1988) *Interferon-induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative transcriptional control.* Genes and Dev. 2: 383-393

Lin R., Heylbroeck C., Pitha P. and Hiscott J. (1998) *Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation.* Mol. Cell. Biol 18 (5) 2986-2996

Littlewood T., Hancock D., Danielian P., Parker M and Evans G. (1995) *A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins.* Nucleic Acids Res. 23: 1686-1690

Lowe S.W., Ruley H.E., Jacks T. and Housman D. E. (1993) *p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents.* Cell 74: 957-967

Macejak D. G. and Sarnow P. (1991) *Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA.* Nature 353: 90-95

Magrath I. (1990) *The pathogenesis of Burkitt's lymphoma.* Adv. Cancer Res. 55: 133-270

Maniatis T., Fritsch E. F. and Sambrook J. (1982) *Molecular cloning- A Laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York 1-3

Marié I., Durbin J. E. and Levy D.E. (1998) *Differential viral induction of distinct interferon- α genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7.* EMBO J. 22: 6660-6669

Marshall C. J. (1991) *Tumor suppressor genes.* Cell 64: 313-326

Matsuyama T., Grossman A., Mittrücker H.-W., Siderovski D. P., Kiefer F., Kawakami T., Richardson C. D., Taniguchi T., Yoshinaga S. K. and Mak T. W. (1995) *Molecular cloning of LSIRF, a lymphoid-specific member of the interferon regulatory factor family that binds the interferon-stimulated response element (ISRE).* Nucleic Acids Res. 23 (12): 2127-2136

Matsuyama T., Kimura T., Kitagawa M., Pfeffer K., Kawakami T., Watanabe N., Kündig T. M., Amakawa R., Kishihara K., Wakeham A., Potter J., Furlonger C. L., Narendran A., Suzuki H., Ohashi P. S., Paige C. J., Taniguchi T. and Mak T. W. (1993) *Target disruption of IRF-1 or IRF-2 results in abnormal type I IFN gene induction and aberrant lymphocyte development.* Cell 75: 83-97

McLellan E. A. and Bird R. P. (1988) *Aberrant crypts: potential neoplastic lesions in the murine colon.* Cancer Res. 48: 6178-6192

Miura M., Zhu H., Rotello R., Hartwig E.A. and Yuan J. (1993) *Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 β -converting enzyme, a mammalian homolog of the C. elegans cell death gene ced-3.* Cell 75: 653-660

Miyamoto M., Fujita T., Kimura Y., Maruyama M., Harada H., Sudo Y., Miyata T. and Taniguchi T. (1988) *Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements.* Cell 54 (6): 903-913

Mohammadi S. A. and Hawkins R. E. (1998) *Efficient transgene regulation from a single tetracycline-controlled positive feedback regulatory system.* Gene Therapy 5: 76-84

Mohammadi S. A., Alvarez-Vallina L., Ashworth L. J. and Hawkins R. E. (1997) *Delay in resumption of the activity of tetracycline regulateable promotor following removal of tetracycline analogues.* Gene Therapy 4: 993-997

Müller M., Briscoe J., Laxton C., Guschin D., Ziemieck D., Sivennoinen O., Harpur A. G., Barieri G., Wüthuhn B. A., Schindler C., Pellegrini S., Wilks A. F., Ihle J. N., Stark G. R. and Kerr I. M. (1993) *The protein tyrosin kinase Jak1 complements defects in interferon α/β and - γ signal transduction.* Nature 366: 129-135

Mullerman J. E. and Pfeffer L. M. (1995) *A novel cytoplasmatic homology domain in interferon receptors.* Trends Biochem. Sci. 20 (2): 55-56

Nelson N., Marks M., Driggers P. H. and Ozato K. (1993) *Interferon consensus sequence –binding protein, a member of the interferon regulatory factor family, suppresses interferon-induced gene transcription.* Mol. Cell. Biol. 13: 588-599

Nguyen H., Lin R. and Hiscott J. (1997) *Activation of multiple growth regulatory genes following inducible expression of IRF-1 or IRF/RelA fusion proteins.* Oncogene 15: 1425-1435

Oie H. K., Gazdar A. F., Buckler C. E. and Baron S. (1977) *High interferon producing line of transformed murine cells.* J. Gen. Virol. 17: 107-109

Oktabe M., Ikawa M., Kominami K., Nakanishi T. and Nishimune Y. (1997) *Green mice as a source of ubiquitous green cells.* FEBS Lett. 407: 313-319

Ossina N.K., Cannes A., Powers V. C., Fitzpatrick P.A., Knight J.D., Gilbert J.R., Shekhtman E.M., Tomel L.D., Umansky S.R. and Kiefer M.C. (1997) *Interferon-gamma modulates a p53-independent apoptotic pathway and apoptosis-related gene expression.* J. Biol. Chem. 272: 16351-16357

Park O.K., Schaefer T.S. and Nathans D. (1996) *In vitro action of Stat3 by epidermal growth factor receptor kinase.* Proc.Natl. Acad. Sci. USA 93: 13704-13708

Pestka S. and Langer J. (1987) *Interferons and their actions.* Annu. Rev. Biochem. 56: 727-777

Pietras R. J., Pegram M. D., Finn R. S., Maneval D. A. and Slamon D. J. (1998) *Remission of human breast cancer xenografts on therapy with humanized monoclonal antibody to HER-2 receptor and DNA-ractive drugs.* Oncogene 17 (17): 2235-2249

- Powell S. M., Zilz N., Beazer-Berclay Y., Bryn T. M., Hamilton S. R., Thribodea S. N., Vogelstein B. and Kinzler K. W.** (1992) *APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis*. Nature 359: 235-237
- Qureshi S. A., Salditt-Georgieff M. and Darnell J. E. Jr.** (1995) *Tyrosine-phosphorylated Stat1 and Stat2 plus a 48-kDa protein all contact DNA in forming interferon-stimulated- gene factor 3*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3829-3833
- Reis L. F. L., Harada H., Wolchok J. D., Taniguchi T. and Vilcek J.** (1992) *Critical role of a common transcription factor, IRF-1, in the regulation of IFN- β and IFN-inducible genes*. EMBO J. 11 (1): 185-193
- Reis L. F. L., Ruffer H., Stark G., Aguet M. and Weissmann C.** (1994) *Mice devoid of IRF-1 show normal expression of type I IFN genes*. EMBO J. 13 (20): 4798-4806
- Revel M. and Chebath J.** (1986) *Interferon-activated genes*. Trends Biochem. Sci. 11: 166-170
- Safer B.** (1983) *2B or not 2B: Regulation of the catalytic utilization of eIF-2*. Cell 33: 7-8
- Sala A., Casella I., Grasso L., Bellon T., Reed J.c., Miyashita T. and Peschle C.** (1996) *Apoptotic response to oncogenic stimuli: cooperative and antagonistic interactions between c-myc and the growth suppressor p53*. Cancer Res. 56: 1991-1996
- Sandgren E. P., Quaife C. J., Pnkert C. A., Palmiter R. D. and Brinster R. L.** (1989) *Oncogene-induced liver neoplasia in transgenic mice*. Oncogene 4: 714-724
- Sato M., Hata N., Asagiri M., Nakaya T., Taniguchi T. and Tanaka N.** (1998) *Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7*. FEBS Lett. 441: 106-110
- Sato T., Selleri C., Young N.S. and Maciejewski J.P.** (1997) *Inhibition of IRF-1 expression results in predominance of cell growth stimulatory effects of interferon-gamma due to phosphorylation of Stat1 and Stat3*. Blood 90: 4749-4758
- Schafer S., Lin R., Moore P., Hiscott J. and Pitha P. M.** (1998) *Regulation of type I interferon gene expression by interferon regulatory factor 3*. J. Biol. Chem. 273: 2714-2720
- Schägger H. and von Jagow G.** (1987) *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. Anaal. Biochem. 166: 368-379
- Schindler C., Fu X.-Y., Improta T., Aebersold R. and Darnell Jr. J. E.** (1992) *Proteins of transcription factor ISGF-3: One gene encodes the 91- and 84-kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon-*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7836-7839

Schmidt A., Chernajovsky V., Schulman L., Federman P., Berissi H. and Revel M. (1979) *An interferon-induced phosphodiesterase degradation (2'-5') oligoadenylate and the C-C-A terminus of tRNA*. Proc Natl. Acad. Sci. USA 76: 4788-4792

Sharf R., Meranro D., Azriel A., Thornton A. M., Ozato K., Petricoin E. F., Larner A. C., Schaper F., Hauser H. and Levi B.-Z. (1997) *Phosphorylation events modulate the ability of interferon consensus sequence binding protein to interact with interferon regulatory factors and to bind DNA*. J. Biol. Chem. 272 (15): 9785-9792

Shimkin M. B. and Stoner G. D. (1975) *Lung tumors in mice: Application to carcinogenesis bioassays*. Adv. Cancer Res. 21: 1-58

Shockett P., Difilippantonio M., Hellman N. and Schatz D. G. (1995) *A modified tetracycline-regulated system provides autoregulator inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6522-6526

Shuai K., Horvath C. M., Tsai Huang L. H., Qureshi S. A., Cowburn D. and Darnell Jr. J. E. (1994) *Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions*. Cell 76: 821-828

Shuai K., Stark G. R., Kerr I. M. and Darnell Jr. J. E. (1993) *A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon-gamma*. Science 261: 1744-1746

Sims S. H., Cha Y., Romine M. F., Gao P.-Q., Gottlieb K. and Deisseroth A. B. (1993) *A novel interferon-inducible domain: Structural and functional analysis of the human Interferon regulatory factor 1 gene promoter*. Mol. Cell. Biol. 13 (1): 690-702

Sinn E., Muller W., Pattengale P., Tepler I., Wallace R. and Leder P. (1987) *Coexpression of MMTV/v-Ha-ras and MMTV/c-myc genes in transgenic mice: synergistic action of oncogenes in vivo*. Cell 49: 465-475

Slattery E., Gosh N., Samata H. and Lengyl P. (1979) *Interferon double-stranded RNA and RNA degradation: activation of an endonuclease by (2'-5')A_n*. Proc Natl. Acad. Sci. USA 76: 4778-4782

Southern E. M. (1975) *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. J. Mol. Biol. 98: 503-517

Stevens A. M., Dieger Y. F., Lu K. A. and Yu-Lee L.-Y. (1995) *Biphasic transcriptional regulation of the interferon regulatory factor-1 gene by prolactin: Involvement of gamma-interferon-activated sequence and Stat-related proteins*. Mol. Endo. 9 (4): 513-234

Tamura T., Ishihara M., Lamphier M. S., Tanaka N., Oishi I., Alzawa S., Matsuyama T., Mak T. W., Taki S. and Taniguchi T. (1995) *An IRF-1 pathway of DNA damage-induced apoptosis in mitogen-activated T lymphocytes*. Nature 376: 596-599

- Tan R. S-P., Taniguchi T. and Harada H.** (1996) *Identification of the lysyl oxidase gene as a target of the antioncogenic transcription factor, IRF-1, and its possible role in tumor suppression.* Cancer Research 56: 2417-2421
- Tanaka N., Ishihara M. and Taniguchi T.** (1994b) *Suppression of c-myc or fosB- induced cell transformation by the transcription factor IRF-1.* Cancer Lett. 83: 829-839
- Tanaka N., Ishihara M., Kitagawa M., Kimura T., Matsuyama T., Lamphier M. S., Aizawa S., Mak T. W. and Taniguchi T.** (1994a) *Cellular commitment to oncogene-induced transformation or apoptosis is dependent on the transcription factor IRF-1.* Cell 77: 829-839
- Tanaka N., Ishihara M., Lamphier M. S., Nozawa H., Matsuyama T., Mak T. W., Aizawa S., Tokino T., Oren M. and Taniguchi T.** (1996) *Cooperation of the tumor suppressors IRF-1 and p53 in response to DNA damage.* Nature 382: 816-818
- Taniguchi T., Lamphier M. S. and Tanaka N.** (1997) *IRF-1: the transcription factor linking the interferon response and oncogenesis.* Biochim. Biophys. Acta 1333: M9-M17
- Ullrich A. and Schlessinger J.** (1990) *Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity.* Cell 61: 203-212
- Veals S. A., Santa Maria T. and Levy D. E.** (1993) *Two domains of ISGF3gamma that mediate protein-DNA and protein-protein interactions during transcription factor assembly contribute to DNA-binding specificity.* Mol. Cell. Biol. 13: 196-206
- Veals S. A., Schindler C., Leonard D., Fu X.-Y., Aebersold R., Darnell Jr. J. E. and Levy D. E.** (1992) *Subunit of an alpha-interferon-responsive transcription factor is related to interferon regulatory factor and Myb families of DNA-binding proteins.* Mol. Cell. Biol. 12 (8): 3315-3324
- Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H. and Reutelingsperger C.** (1995) *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V.* J. Immunol. Methods 184: 39-51
- Vlach J., Hennecke S., Alevizopoulos K., Conti D. and Amati B.** (1996) *Growth arrest by the cyclin-dependent kinase p27Kip1 is abrogated by c-myc.* EMBO J. 15: 6595-6604
- Vogelstein B. and Kinzler W.** (1993) *The multistep nature of cancer.* TIG 9: 138-141
- Wagner A.J., Meyers C., Laimins L.A. and Hay N.** (1993) *C-Myc induces the expression and activity of ornithine decarboxylase.* Cell. Growth Differ. 4: 879-883
- Walters M.C., Magis W., Fierings S., Eidemiller J., Scalzo D., Groudine M. and Martin D.K.** (1996) *Transcriptional enhancers act in cis to suppress position-effect variegation.* Genes Dev. 10: 185-195

- Watanabe N., Sakakibara J., Hovanessian A. G., Taniguchi T. and Fujita T.** (1991) *Activation of IFN- β element by IRF-1 requires a posttranslational event in addition of IRF-1 synthesis.* Nucleic Acids Res. 19 (16): 4421-4428
- Weaver B. K., Kumar K. P. and Reich N.C.** (1998) *Interferon regulatory factor 3 and CREB-binding protein/p300 are subunits of double-stranded RNA-activated transcription factor DRAFI.* Mol. Cell. Biol 18: 1359-1368
- Weinberg R. A.** (1991) *Tumor suppressor genes.* Science 254: 1138-1146
- Weisz A., Kirchhoff S. and Levi B.-Z.** (1994) *IFN consensus sequence binding protein/ICSBP is a conditional repressor of IFN inducible promoters.* Int. Immunol. 6 (8): 1125-1131
- Willman C. L., Sever C. E., Pallavicini M. G., Harada H., Tanaka N., Slovak M. L., Yamamoto H., Harada K., Meeker T. C., List A. F. and Taniguchi T.** (1993) *Deletion of IRF-1, mapping to chromosom 5q31.1 in human leukemia and preleukemic myelodysplasia.* Sience 259: 968-971
- Wilson C., Bellen H.J. and Gehring W.J.** (1990) *Position effects on eukaryotic gene expression.* Ann. Rev. Cell. Biol. 6: 679-714
- Yim J. H., Wu S. J., Casey M. J., Norton J. A. and Doherty G. M.** (1997) *IFN regulatory factor-1 gene transfer into an aggressive, nonimmunogenic sarcoma suppress the malignant phenotype and enhances immunogenicity in syngeneic mice.* J. Immunol. 158: 1284-1292
- Yoneyama M., Suhara W., Fukuhara Y., Fukuda M., Nishida E. and Fujita T.** (1998) *Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300.* EMBO J. 4: 1087-1095
- Zhang L. and Pagano J. S.** (1997) *IRF-7, a new interferon regulatory factor associated with the Epstein-Barr virus latency.* Mol. Cell. Biol. 17: 5748-5757
- Zhang Y., Riesterer C., Ayrall A.-M. Sablitzky F., Littlewood T. D. and Reth M.** (1996) *Inducible site-directed recombination in mouse embryonic stem cells.* Nucleic Acids Res. 24 (4): 543-548
- Zhou A., Hassel B. A. and Silverman R. H.** (1993) *Expression cloning of 2-5-dependent RNase: a uniquely regulated mediator of interferon action.* Cell 72: 753-765